

筑波大学  
博士(医学)学位論文

中枢神経原発悪性リンパ腫における遺伝子変異  
解析の臨床的意義

2018

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

服 部 圭 一 朗

本論文の作成において、

British journal of haematology 誌に掲載された

*MYD88* (L265P) mutation is associated with an unfavourable outcome of primary central nervous system lymphoma. Hattori, K.; Sakata-Yanagimoto, M.; Okoshi, Y.; Goshima, Y.; Yanagimoto, S.; Nakamoto-Matsubara, R.; Sato, T.; Noguchi, M.; Takano, S.; Ishikawa, E.; Yamamoto, T.; Matsumura, A.; Chiba, S., *British journal of haematology* **2017**, *177* (3), 492-494. Doi: 10.1111/bjh.14080

及び

Cancer science 誌に掲載された

Clinical significance of disease-specific MYD88 mutations in circulating DNA in primary central nervous system lymphoma. Hattori, K.; Sakata-Yanagimoto, M.; Suehara, Y.; Yokoyama, Y.; Kato, T.; Kurita, N.; Nishikii, H.; Obara, N.; Takano, S.; Ishikawa, E.; Matsumura, A.; Hasegawa, Y.; Chiba, S., Clinical significance of disease-specific MYD88 mutations in circulating DNA in primary central nervous system lymphoma. *Cancer science* **2018**, *109* (1), 225-230. Doi: 10.1111/cas.13450

及び

Genetic evidence implies that the primary and relapsed tumors arise from common precursor cells in primary CNS lymphoma. Hattori, K.; Sakata-Yanagimoto, M.; Kusakabe, M.; Nanmoku, T.; Suehara, Y.; Matsuoka, R.; Noguchi, M.; Yokoyama, Y.; Kato, T.; Kurita, N.; Nishikii, H.; Obara, N.; Takano, S.; Ishikawa, E.; Matsumura, A.; Muratani, M.; Hasegawa, Y.; Chiba, S., *Cancer science* **2018**, *110* (1), 401-407. Doi: 10.1111/cas.13848

の内容を再利用した。

# 目次

1.	序文	6
2.	PCNSL における <i>MYD88</i> L265P 変異と予後との関連について	
2. 1	背景	17
2. 2	材料と方法	20
2. 3	結果	29
2. 4	考察	44
3.	PCNSL における cell-free DNA 中の疾患特異的 <i>MYD88</i> 変異の臨床的 意義	
3. 1	背景	48
3. 2	材料と方法	51
3. 3	結果	60
3. 4	考察	
4.	PCNSL における原発腫瘍及び中枢神経外再発腫瘍の遺伝子変異プロフ ァイルの比較を通じた、共通前駆細胞の存在の確認	
4. 1	背景	72
4. 2	材料と方法	80

4. 3	結果	89
4. 4	考察	106
5.	全体の結語	129
6.	謝辞	130
7.	出店	131
8.	参考文献	132

## 1. 序文

中枢神経原発悪性リンパ腫（primary central nervous system lymphoma: PCNSL）は中枢神経系に局限して発症する、び慢性大細胞性 B 細胞リンパ腫（diffuse large B cell lymphoma: DLBCL）である<sup>1</sup>。DLBCL とは、B 細胞の腫瘍性増殖を来している疾患のうち、び慢性増殖の病理像を呈するもの全般を指すものと定義されており、発症部位は多様でありどこでも発症しうるとされているが、約 60% がリンパ節で発症し、約 40% 程度は節外性（主に消化管や骨髄などに発症すると言われている<sup>2</sup>。中枢神経内にのみ発症する PCNSL は DLBCL の特殊亜型の一つに分類される。PCNSL の好発年齢は 60 歳以降である。先進国を中心としてその発症率は増加傾向で、原発性脳腫瘍のうち 3–5% を占めるとされている<sup>3</sup>。

PCNSL の診断には様々な方法が用いられており、magnetic resonance imaging (MRI) や positron emission tomography/computed tomography (PET/CT) による画像診断もその一つであるが、脳悪性腫瘍の中でも頻度の高い膠芽腫や、炎症性疾患である多発性硬化症などと所見が非常に類似しており、鑑別は難しく、開頭生検や穿頭生検による病理組織診断のみが標準的診断法となっている<sup>4</sup>。画像所見の非特異性に加えて、初発症状も脳の解剖学により多

---

Induction chemotherapy: 5-7 cycles every 2 weeks

IV Rituximab 500 mg/m<sup>2</sup> day 1

IV MTX 3.5 gm/m<sup>2</sup> day 2

IV Leucovorin 25mg initiated 24 h after MTX administration every 6 h for 3 days

IV Vincristine 1.4 mg/m<sup>2</sup> (maximum dose, 2 mg) day 2

PO Procarbazine 100 mg/m<sup>2</sup> days 1-7 (during odd-numbered cycles only)

IT MTX 10mg + PSL 20mg + AraC 30mg between day5-12 (patient with positive CSF cytology only)

Consolidation chemotherapy: 2 cycles every 1 month after completion of WBRT

IV Cytarabine 3 gm/m<sup>2</sup>/d (maximum dose, 6 g) day 1,2

SC Granulocyte colony-stimulating factor 2 μg/kg day5~

---

Table 1 若年者用プロトコール

IV; 経静脈投与 (intravenous)、PO; 経口投与 (per os)、MTX; メソトレキセート (methotrexate)、IT; 髄腔内投与 (intrathecal)、CR; 完全寛解 (complete response)、PR; 部分寛解 (partial response)

彩であることから、早期診断が難しく、診断までに長時間を要することが多いのが現状である。

一番の問題点は予後不良であること、そして、それにも拘らず、他の全身性に発症するタイプの DLBCL と比較すると予後予測モデルや有効な治療法の確立が立ち遅れていることにある。これまでに、高用量メソトレキサート (Methotrexate: MTX) と全脳放射線療法が最も奏功する治療法として用いられており、最近はそれに加えて、CD20 に対するモノクローナル抗体薬であ

---

**Induction chemotherapy**

IV MTX 1 g/m<sup>2</sup> days 1, 10, and 20

IV ranimustine 40 mg/m<sup>2</sup> day 1

PO procarbazine 60 mg/m<sup>2</sup> days 1–7

IV or PO methylprednisolone 120 mg/m<sup>2</sup> every other day  
from days 1 to 20 and 60 mg/m<sup>2</sup> from days 21 to 45

IT MTX 15 mg + cytarabine 40 mg days 1, 5, 10, and 15

PO leucovorin 25 mg initiated 24 h after MTX administration every 6 h for 3 days

**Maintenance chemotherapy:** 5 more cycles every 6 weeks from day 45 in the case of CR or PR

IV MTX 1 g/m<sup>2</sup> day 1

IV ranimustine 40 mg/m<sup>2</sup> day 1

PO procarbazine 60 mg/m<sup>2</sup> days 1–7

IT MTX 15 mg + cytarabine 40 mg day 1

PO leucovorin 25 mg initiated 24 h after MTX administration every 6 h for 3 days

---

**Table 2** 高齢者用プロトコール(the modified version of the EORTC protocol)

IV; 経静脈投与 (intravenous)、PO; 経口投与 (per os)、MTX; メソトレキセート (methotrexate)、IT; 髄腔内投与 (intrathecal)、CR; 完全寛解 (complete response)、PR; 部分寛解 (partial response)

るリツキシマブ(rituximab)が導入されるようになった。PCNSL の放射線治療に関する既報のメタ解析によると<sup>5)</sup>、放射線照射に伴う神経障害の発症率が、60歳以上だと有意に増加すると報告されているため、初期治療で放射線照射治療を行うのは 60 歳未満に限定することとしている。また、放射線照射以外でも MTX の大量投与による合併症リスクも、年齢が上がるほど増加することが予想されたため、MTX の投与量は投与間隔も、60 歳を境にして分けてプロトコールが作成された。具体的には、60 歳未満に対する治療レジメンは、Memorial Sloan



Kettering Cancer Center のグループにおいて報告されたプロトコール<sup>6</sup>をベースにして作られており、大量 MTX (3.5g) をベースとして、Rituximab と、Procarbazine と vincistine, MTX 髄注を加えた治療を 2 週間毎に計 5~7 回行い、その後放射線照射をした後に大量 cytarabine を投与するというプロトコールである (Table 1)<sup>7</sup>。一方、60 歳以上は European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC)において報告された治療法<sup>8</sup>をベースにして用いられてきた高齢者用のプロトコールである the modified version of the EORTC protocol で治療されている (Table 2)。具体的には、1g の MTX を 10 日毎に計 6 回投与し、併行して MCNU、Procarbazine、髄注を行うというレジメンである<sup>9-10</sup>。高齢者は若年者と比較すると代謝効率が落ちるため、MTX の毒性を抑えるために中等量の MTX (1g) を小刻みに投与している点と、放射線照射がレジメンに含まれない点が若年者プロトコールとの大きな違いである。

両方のプロトコールの治療成績については、60 歳未満の若年者用プロトコールの治療成績は、3 年生存率 69%、3 年無再発生存率 56%<sup>7</sup>、60 歳以上の高齢者用プロトコールの場合は 3 年生存率 56%、3 年無再発生存率 30%となっており<sup>10</sup>、他に報告されている MTX ベースの多剤併用療法及び放射線照射を使用したプロトコールと同等の治療成績であった。しかし、当科で行っている治療法以外にも様々な治療プロトコールがこれまでに報告されているが、どのような薬

剤を併用することが有力であるかという問題については答えが出ていない。

実際、治療の進歩に伴って治療成績は改善したものの、他の全身性に発症するタイプの DLBCL と比較すると、依然として予後不良であり、平均生存期間は 2－4 年である<sup>3</sup>。これまでの PCNSL に関する臨床研究で、意識障害の有無、年齢、Performance Status (PS)、腎機能などの臨床パラメーターが予後予測因子として同定されている<sup>9,11</sup>。しかし、大量 MTX の有効な投与量や投与間隔については、いまだ確立した知見は存在せず、また予後予測の指標となる適切なマーカーがない。

PCNSL の予後予測や病態を考える上で有用と思われるのが、遺伝子発現パターンに基づいた分類、及びそれらと遺伝子変異との関係である。PCNSL は先述の様に、DLBCL の中の特殊な一亜型である。DLBCL において、遺伝子変異や臨床予後との関係を考える上で重要な概念が、遺伝子発現パターンに基づいた分類である。Alzadeh らの研究グループが、DLBCL の腫瘍細胞を cDNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析することにより、B 細胞分化段階を示唆する遺伝子発現のパターンから DLBCL を胚中心 B 細胞型 (Germinal center B-cell-like (GCB) type) と活性型 B 細胞型 (Activated Bcell-like (ABC) type) の 2 つに分類し、更に ABC 群は GCB 群に比べて有意に予後不良を示すことを報告した<sup>12</sup>。更にその後の 2002 年に National Cancer Institute のグループも同様に

マイクロアレイを用いて DLBCL を解析し、DLBCL を GCB type と ABC type, およびそれらのどちらにも所属しないタイプを type 3 として分類できることを報告した<sup>13</sup>。この type 3 に分類された群は予後解析では ABC type と同様の予後を示していることから、ABC type とともに non-GCB type という括りで捉えられる傾向にある<sup>13</sup>。また後に Hans らは病理診断の観点からこの分類に注目し、DLBCL を組織免疫染色を用いて CD10, Bcl-6 および MUM-1 の 3 つ発現によって GCB type を同定する手法を開発した<sup>14</sup>。また、GCB type として同定されなかった残りの DLBCL 群を non-GCB type とし、National Cancer Institute のグループ cDNA microarray 解析における ABC type と type 3 に相当する群としている<sup>13-14</sup>。また、この方法で分類した場合でも、non-GCB が GCB に比べ有意に予後不良であることが示された<sup>14</sup>。CD10, BCL6, MUM1 などの蛋白の発現は、mRNA の発現パターンによって規定されており、またこの mRNA の発現パターンの違いは、一般に腫瘍細胞のゲノムの状態の差異に起因していることが推測できる。つまり、染色体異常や遺伝子異常に代表されるようなゲノム異常が、DLBCL の病型に深く関係している可能性が考えられる。近年になって次世代シーケンサーの登場により造血器腫瘍を対象とした網羅的遺伝子発現解析が多数施行されており、DLBCL に対しても同様のゲノム異常の解析が行われており、これまでの報告で多数の遺伝子変異が同定された。

Pasqualucci<sup>15</sup> や Morin<sup>16</sup> らによる DLBCL の解析から、56~109 の遺伝子において変異が同定されており、特定の変異は GCB type もしくは non-GCB type のどちらかに偏って認められる傾向があることを確認した。GCB type に高頻度に認められる変異の多くはヒストン修飾酵素などのエピゲノム関連因子に関する遺伝子 (*CREBBP*, *EZH2*, *EP300* など)であり、一方で NF $\kappa$ B シグナル伝達経路関連因子をコードする遺伝子 (*CD79B*, *MYD88*, *CARD11* など) の変異は、non-GCB タイプに集積する傾向が確認された<sup>6,15-16</sup>。具体的には NF $\kappa$ B 関連因子の変異は non-GCB DLBCL 症例の約 67%に<sup>17</sup>、またエピゲノム関連因子の変異は DLBCL の約 48%に<sup>18</sup> 存在することが確認され、またそれぞれの系統の遺伝子変異の多くは、互いに排他的である傾向が確認されていることから、DLBCL の病態を把握する上で、これら 2 系統の異常が重要である可能性が推測される。

PCNSL は病理組織型が DLBCL であるため、同様に遺伝子発現パターンを確認することが重要であると予想される。PCNSL の既報によると、遺伝子発現や遺伝子変異のパターンは全身性に発症した DLBCL とは様相が異なっている。まず、GCB、non-GCB の占める割合については、DLBCL の場合はともに 50% 前後であるのに対して、PCNSL の場合は報告によって乖離はあるものの、66~90%が non-GCB タイプに分類され、GCB タイプよりも non-GCB に偏って

いる傾向を認めた<sup>19-21</sup>。Hans の分類に則って、CD10、BCL6 と MUM1 の発現率で比較された報告を見ると、まず CD10 は PCNSL の方が DLBCL の場合よりも有意に陽性率が低く (PCNSL; 2.4% vs DLBCL; 26.4%)、一方で MUM1 は PCNSL の方が全身性の DLBCL よりも有意に陽性率が高い (PCNSL; 92.6% vs DLBCL; 50.3%) とされており、cDNA マイクロアレイ解析での遺伝子発現パターンが non-GCB に偏っていることの裏付けとなっていると言える<sup>19</sup>。また、PCNSL においては non-GCB と GCB とで予後の有意差は認められていない<sup>19</sup>。

遺伝子異常の点では、PCNSL に対して行われたゲノム異常の解析においてこれまでの報告で多数の遺伝子変異が同定されたが<sup>22-26</sup>、全身性の DLBCL と違うのは、エピゲノム関連因子の遺伝子よりも、NFκB シグナルの活性化に関与のある *MYD88*, *CD79B*, *CARD11* などの遺伝子変異の頻度が高い傾向にあることが報告されている点である<sup>24</sup>。

PCNSL は blood brain barrier によって抹消から遮断された中枢神経内という免疫学的に寛容な環境に限局して発症する腫瘍であり、このようなフェノタイプの面でも全身性の DLBCL とは違う特徴を持っている。そのため、全身性の DLBCL とは別個に解析される必要があると思われるが、PCNSL は発症頻度が低いことや、手術では診断目的の生検術しか行われないことから、少量の腫瘍摘出にとどまることが一般的となっており、このため遺伝子解析が可能なサ

ンプル収集が容易でないことから、その分子遺伝学的解析の障害となっており、特に遺伝子変異の臨床的意義についての報告は少数に限られている。

以上のように、PCNSL は造血器腫瘍の中でも極めて予後不良なタイプの疾患であるのにも拘らず、発症頻度が限定されていることや、腫瘍が頭蓋内にあることによる腫瘍組織入手の困難さなどから、遺伝子変異の臨床的意義の解明や臨床への応用を目的としたゲノム解析が充分に行われていないのが現状である。

そこで、PCNSL の患者の腫瘍組織に対して次世代シーケンサーを用いた網羅的なゲノム解析を行い臨床情報と対比することにより、下記 3 点を目標として研究を行った。

- ・研究 1) 高頻度に認められる遺伝子変異を同定し、臨床経過との関連について解析すること。
- ・研究 2) 血液中などに含まれている生体物質を指標として検査を行う技術である liquid biopsy を<sup>27)</sup>、PCNSL に対して活用できるか否かを判断するために、血中遊離 DNA (cell-free DNA) に対する遺伝子変異解析を行い、その有用性について検討すること。
- ・研究 3) 中枢神経外に再発した 5 症例について、原発と再発病変に対して解析を行い比較をすることで、再発形式及び PCNSL の起源について検討す

る。

尚、各種臨床検体の使用にあたり、筑波大学附属病院における研究倫理審査委員会において承認された臨床研究のプロトコールに従って、まずは全ての患者より書面での同意を得た上で、各種検体を採取し解析を行った (Figure 1)。今回、研究 1 で取り扱った PCNSL の脳腫瘍検体や患者の骨髄検体については、臨床研究「造血器腫瘍及び固形腫瘍におけるゲノムおよびエピゲノム異常の網羅的解析 (H24-75)」に従って管理し、また研究 2 において使用した血清や血漿については、臨床研究「つくば臨床検査教育・研究センター事業における診療検体の保管と共同研究での利用 (H22-603)」に則って、つくば i-laboratory LLP で保管されていた検体を取り寄せ、「造血器腫瘍及び固形腫瘍におけるゲノムおよびエピゲノム異常の網羅的解析 (H24-75)」に従って解析を行った。

上記 3 研究につき、章立てを行い説明する。

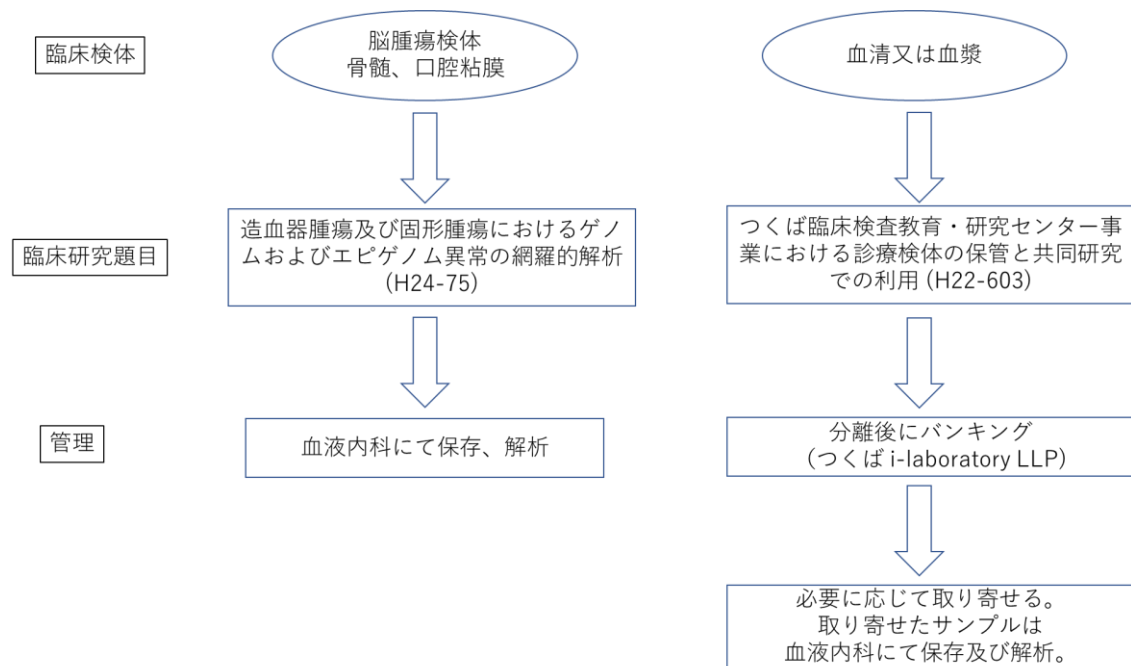


Figure 1 各種臨床検体と臨床研究題目との関連について



## 2. PCNSL における *MYD88* L265P 変異と予後との関連について

### 2.1 背景

DLBCL は腫瘍細胞における遺伝子発現を cDNA マイクロアレイで網羅的に解析することによって、その発現段階の違いから GCB と non-GCB の 2 つに分類され、non-GCB 群は GCB 群に比べて有意に予後不良を示すことが報告されている<sup>12,14</sup>。PCNSL は、典型的には、non-GCB タイプの遺伝子発現パターンを示すことが多いとされている<sup>28</sup>。Non-GCB type の DLBCL においては、*MYD88*、*CD79B* および *CARD11* 遺伝子などのような、NFκB シグナル伝達経路に関係する遺伝子の変異を高頻度に認める傾向があり<sup>28</sup>、実際の *MYD88*、*CD79B* および *CARD11* の変異アレル頻度は、non-GCB DLBCL において 15~30%、17~23%、8~18%と報告されている<sup>28</sup>。PCNSL ではそれらの遺伝子変異頻度は 40-79%、30-44%および 11-30%と、更に高頻度に検出されていることが示されている<sup>23-24,29</sup>。さらに、PCNSL においては他にも何種類かの遺伝子変異が、他のタイプの DLBCL より高頻度で検出されることが知られており、*BTG2* (22-38%)、*TBL1XR1* (7-23% 30%)、*PRDM1* (7-20%) および *TNFAIP3* (11-20%) などが例として挙げられる<sup>23-26</sup>。

一方で、特定の臨床パラメーターを利用した PCNSL 患者の治療成果の予測についてはいくつか報告があるものの、これらの変異の臨床的関連性は依然として不明である。予後との関連が予想される臨床パラメーターの中には、意識レベルの変化とクレアチニンクリアランス (CrCl) の上昇が含まれる<sup>9</sup>。年齢>50歳、Karnofsky パフォーマンススコア<70 (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center 予後スコア)<sup>11</sup>;脳脊髄液タンパク質濃度および深部脳構造のリンパ腫の関与 (国際結節性リンパ腫研究グループ予後スコアリングシステム)<sup>30</sup>などの項目も、予後因子として同定された。

DLBCL の場合は non-GCB type の方が GCB type よりも予後が悪いと報告されており、遺伝子発現パターンが予後に影響していることが示されている<sup>12</sup><sup>13</sup>。また、Non-GCB type の DLBCL には NF $\kappa$ B シグナル伝達経路に関係した遺伝子変異が集積する傾向にあるため、それらの遺伝子変異が予後に影響している可能性についても推測できる<sup>15-16</sup>。実際に、*MYD88* 遺伝子の変異が DLBCL の予後に影響していることを報告した論文もある<sup>31</sup>。一方で、PCNSL の予後が不良である原因の一つとして、PCNSL において non-GCB type が高頻度に認められることを挙げている報告もあるが、実際には PCNSL において non-GCB type と GCB type とで予後の有意差は確認されておらず、ましてこれらの遺伝子発現パターンと遺伝子変異との関係について考察した報告も認めていないの

が現状である。そのため、PCNSLにおいては最近の遺伝子変異に関する知識と  
予後因子との関連については未だ明らかになっていない部分が多いと言える。

筑波大学血液内科においては、先述した通り 60 歳を境目として治療プロトコ  
ールを分けており、60 歳以上の患者に対しては一律で高齢者プロトコールによ  
る治療を行っている（全身状態が悪く、化学療法を行うのに適切ではないと判断  
される症例は除く）<sup>9-10</sup>。そこで、PCNSL の臨床転帰に及ぼす遺伝子変異の影響  
を明らかにするために、同一の高齢者プロトコールによる治療を受けた患者群  
を対象に本研究を行った。

## 2.2 材料と方法

### 臨床検体

脳外科手術によって切除された PCNSL 腫瘍組織と同患者の骨髄は筑波大学附属病院から収集され、ゲノム解析は同施設における研究倫理審査委員会承認のもと行われた（臨床題目：「造血器腫瘍及び固形腫瘍におけるゲノムおよびエピゲノム異常の網羅的解析」 承認番号 H24-75, Figure 1）。臨床試料の研究への利用については、各患者より書面での同意を得た上で行われた。

すべての症例が 2005 年 3 月~2015 年 5 月の間に診断され、筑波大学附属病院において European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC)において報告された治療法<sup>8</sup>をベースにして用いられてきた高齢者用のプロトコルである the modified version of the EORTC protocol で治療されている (Table 1)<sup>9-10</sup>。

臨床パラメーターに関する情報は臨床記録から後ろ向きに収集された。主に、年齢や Karnofsky Performance Status (KPS)、血清 LDH レベル、深部脳構造におけるリンパ腫病変の有無、脳脊髄液中のタンパク質濃度、意識障害、および化学療法開始時のクレアチニンクリアランス (Creatinine clearance; CrCl)などの臨床情報を確認した。意識レベルについては Japan coma scale (JCS)を用いて評価し、JCS 0-1 以外の意識レベルを意識障害ありとして定義した。

## 免疫染色

つくばヒト組織診断センターに依頼し、PCNSL と診断された 42 例分のホルマリン固定した未染スライドに対して CD10、MUM-1、BCL-6 の抗体を用いた免疫組織化学的染色を施行した。

筑波大学附属病院病理部にて、Hans らが以前に提唱した方法を基に、便宜的に全 42 症例の PCNSL 細胞を GCB 型と non-GCB 型に分類した<sup>14</sup>。CD10、MUM-1、BCL-6 の 3 種類の抗体の有無により判定を行い、CD10 陽性で GCB 型、CD10 陰性かつ BCL6 陰性で non-GCB 型、CD10 陰性で BCL6 陽性の場合には MUM1 陽性で non-GCB 型、MUM1 陰性で GCB 型と判定した。

## DNA 抽出

QIAamp DNA ミニキット (Qiagen) を用いて、凍結保存していた腫瘍組織及び、骨髄からゲノム DNA を抽出した。QIAGEN プロトコールに従って QIAamp DNA FFPE 組織キットを用いて、Formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) からゲノム DNA を抽出した。DNA 濃度は Qubit flourometric (Thermo Fisher Scientific) によって測定した。

## ターゲットリシーケンス

ターゲットリシーケンスとは、ゲノム全体ではなく、遺伝子の特定の領域を単離してシーケンスする技術である。必要な領域にだけシーケンスを集中させることにより、研究者は特定の目的領域に時間、費用、およびデータ解析を集中させることができる。

過去に報告された、PCNSL のゲノム解析に関する論文を参照し、PCNSL において特に変異アリル頻度が高いと思われる 12 遺伝子を選択した (Table 3)。同遺伝子領域に対するプライマーは、Ion AmpliSeq Designer (<https://www.ampliseq.com/browse.action>) を利用して設計した。Ion AmpliSeq Library Kit 2.0 (Thermo Fisher Scientific) のプロトコールに則って、ライブラリー作製を行った上で、Ion One Touch 2 System を使用してテンプレート調製を行い、Ion PGM (Thermo Fisher Scientific) によりターゲットリシーケンスを施行した。本体機器附属の Torrent Suite ソフトウェアを用いて変異解析を行った (Figure 2)。

次に Figure 3 に示したデータ解析パイプラインに則って、変異の絞り込みを行った。具体的には、まずは Web ベースのアプリケーションである wANNOAR (<http://wannovar.wglab.org/>) に、解析で得られたデータをインプットし変異データのアノテーションを行った。次に synonymous な変異は除外した。骨髓

もしくは口腔粘膜という正常対照サンプルがあり、こちらに変異がなくて腫瘍にだけ変異があることを確認した場合は体細胞変異としてリストに残した。また、正常対照サンプルが無い場合は、SNP データベースに登録されている場合は生殖細胞系列変異とみなしてリストから除外した。また、Variant allele frequency が 9%未満のデータについては、サンガーシーケンスによる検証が困難であるため、今回はこれらもリストからは除外した。

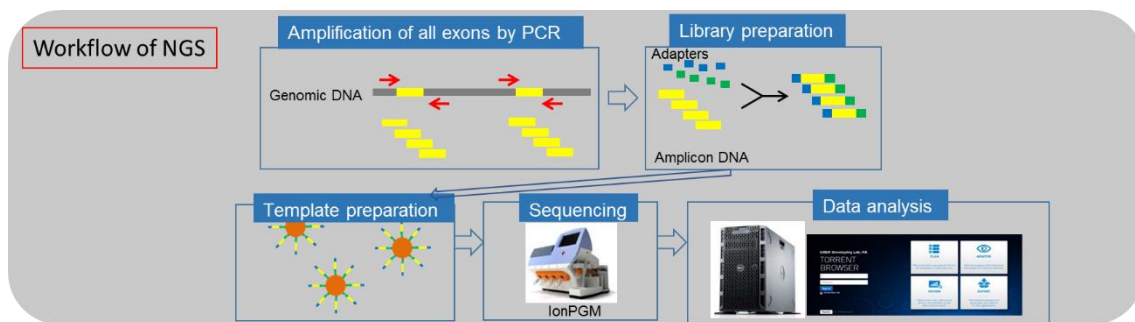


Figure 2 Ion Ampliseq system ワークフロー

(<http://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/Documents/PDFs/jp/catalogs/dl->

ION064-B1404-

OT.pdf#search=%27Ion+AmpliSeq%E2%84%A2+DNA+%E3%82%AB%E3%82%B9%E3

%82%BF%E3%83%A0%E3%83%91%E3%83%8D%E3%83%ABAmpli%27)

<i>B2M</i>
<i>BTG2</i>
<i>CARD11</i>
<i>CD79B</i>
<i>MYD88</i>
<i>PIM1</i>
<i>PRDM1</i>
<i>TBL1XR1</i>
<i>TNFAIP3</i>
<i>TOX</i>
<i>PRKCD</i>
<i>TMEM30A</i>

Table 3 ターゲットリシーケンスによって解析された 12 遺伝子のリスト  
PCNSL において特に発現頻度が高いと思われる 12 遺伝子を選択し,解析を行った。

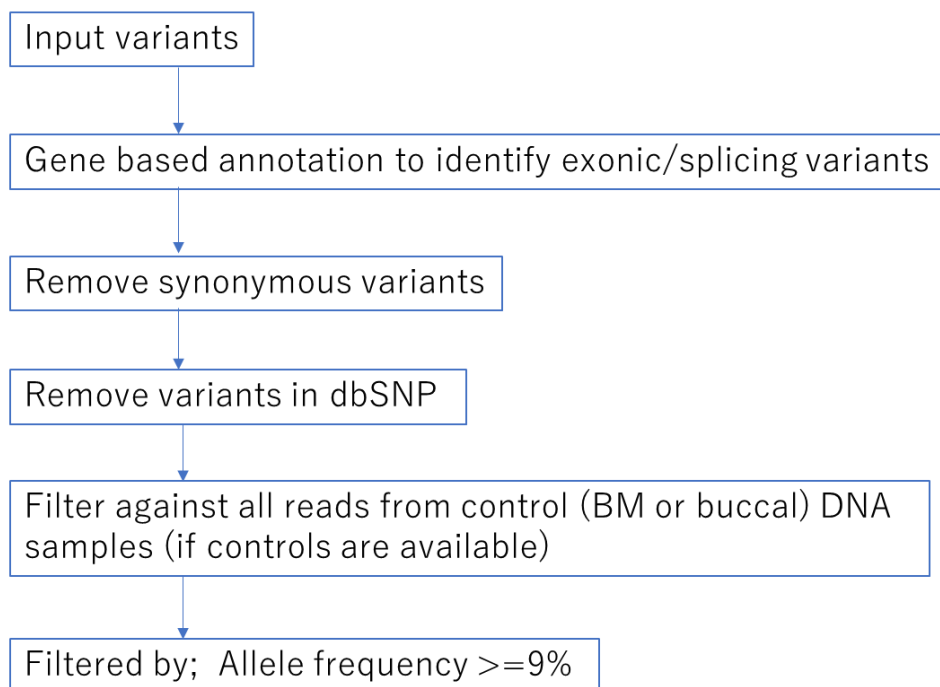


Figure 3 データの解析パイプライン



## サンガーシーケンス

ターゲットリシーケンスにて検出された遺伝子変異に対して、サンガーシーケンスによる検証を行った。

検出された遺伝子変異の近くの遺伝配列を参考にした上で、プライマーを Primer Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)を用いて設計し作成した（プライマー一覧, Table 4）。各々の検体から抽出した DNA に対して、KOD plus Neo (TOYOBO Life Science, Osaka, Japan)を耐熱 DNA ポリメラーゼ (DNA polymerase)として用いて PCR を行った。

増幅プロトコールは 94℃で 1 分、その後 98℃で 10 秒 68℃で 30 秒の 2 ステップサイクルを 39 サイクル、終了後に 4℃で保存した。この PCR 産物を、Exosap IT (Thermo Fisher Scientific)で精製した後に、ABI Big dye terminators で反応させ、ABI 3130 genetic analyzer を使用して DNA 配列を解析した。

gene mutation	Exon	Forward	Reverse
<i>BTG2</i>	1	TCTTGTGGACCCGCACTTC	CGGCATGCGCTCACCTG
	1	GCGACATGAGCCACGGGAA	CCGCAGGAGTAGAAGAAAGACGG
	2	CTCTCCTCCTGTCCCTTGAC	GTCCATCTTGTGGTTGATGCG
	2	GAGGTGTCCTACCGCATTGG	ACAGTTCCCCAGGTTGAGGT
	2	GTAACGCTGTCTTGTGGACC	CCCTCGGCATGCGCTC
	2	ATGAGCCACGGGAAGGGAAC	CCGCAGGAGTAGAAGAAAGACG
	2	CTGGTCCTGTCTCCACAGAGC	CCTCGTACAAGACGCAGATGG
	2	ACCCCTATGAGGTGTCCTACC	GAGGTATGTGGTGGCCTGTT
<i>MYD88</i>	5	CTTAGATGGGGGATGGCTGT	GGAACCTCTTCTTCATTGCCTTGATAC
	4	GTGTGTCTGACCGCGATGT	CCTGTGGCAACTTAGTTACAGC
	4	GGCCCTTCCTGAAGCTATTCC	AGAGGCCCCACCTACACATT
<i>CD79B</i>	2	CACAGGACATAGTCGCACACA	GTAGCTCCGGGAACATAGAGG
	5	CCAACCACACCAGCAGATAGT	TCTTGCAGAATGCACCTCACT
	5	GGTGCTCACCTACAGACCAC	TACGAGGTAAGGAGAGGGGC
	5	TGTCCGCAGCGTCACTATG	GGGACACTAACACTCTGATCTCC
	5	CCTCTCCTTACCTCGTAGGTGT	CCACTGGCTCACCAATTCAA
	5	GTCCGCAGCGTCACTATGT	CTGGGGGACACTAACACTCTGA
	5	CAACCACACCAGCAGATAGT	TCTTGCAGAATGCACCTCAC
<i>CARD 1 1</i>	5	GCAGCTTGATGACCTCGTTC	TGGGCAGAGTGAGTAAAGAGC
	5	GCAGCTTGATGACCTCGTTC	CAAGGCTGTGAGTCTCGCTC
	5	GCAGCTTGATGACCTCGTTC	TGGGCAGAGTGAGTAAAGAGC
	5	GAAGGTTAGCAGCTCCACGC	TGCGTCTGGAACCTCCTTT
	8	TCACAGTCCTTTCCAGGGT	GACCATGCCAGCTTAGGGAG
	8	GTCCTTTCCAGGGTCGAG	CCTTGAGCCCCAACAGTCAG
	9	GCTTGCTCTCCAGGTTGACGAT	TGGGTTGGGATGATGCCTGTC
	9	GGTCCAGGTTGTTGCTGTCTT	TGGGTGCAACCCCCAAAG
	13	GTAAGGAGGCTTGGCATGGTG	GAATTGAGTCCCTGCGTGTGT
	15	GGCAAGGGGTCTTTATCCCA	GCCACCCCTGGTACTGATGG
	15	AACATGAGGTTGACCTGCTCCAG	CTGCCCGGGAAGAGTAGGGA
	21	GCGGTCCCCATGTACCTTC	GCAGCACCTGTCTGTTTAGA
<i>PIM1</i>	3	CGAGGGAACCTGACGGAGA	GACCACTTCCATGGGCACTC
	3	GACCGGATTTCCGACTGGG	CTCCAGGATCAGGACGAAACT
	4	CCCGACAGTTTCGTCTGAT	ACCCGAAGTCGATGAGCTTG
	4	GACGAGGGAACCTGACGG	CTCACCTTCTTCAGCAGGACC
	4	AGAAGGACCGGATTTCCGAC	TCTCCAGGATCAGGACGAAAC
	4	CTCGCCCTGCAGCCTAAT	CTCCAGCACCTGCCAGAAG
	4	TCGACTTCATCACGGAAGGG	CCGTGTAGACGGTGTCTTG
	5	GCAGACATGCATCCCTTCAT	CTCTGGGCTAAGGAGAGTGGA
	5	GAGTGGATCCGCTACCATCG	GCCAGGGGTTTCCATCAGTT
	5	CACAGGGACCCGAGTGTATAG	GGCCAGGGGTTTCCATCAGT

Table 4 使用したプライマーの一覧

gene mutation	Exon	Forward	Reverse
<i>TNFAIP3</i>	3	CTCAGTACATGTGGGGCGTT	AGGGGGAAAAACCTACCCGA
	3	GTCCCCTAGAATAGCAGTAGGG	GAACAGCGCCTTCCTCAGTA
	7	CTTTTGGTCTTCAGGTTGGATG	GCACTCATGGCATAAAGGCTG
	7	CTTTTGGTCTTCAGGTTGGATGA	TCACAGACATGAAGAAGGGGC
	9	CTCTGCATGGAGTGTCAGCA	GAGGTGACCCACCTGTTTCC
<i>TMEM30A</i>	1	GATTCTGGGCGCTGGGAAAGA	GGATAACACGGCCTTCAAACAGC
	3	AGCAAAGCACTAGAATCTCCATT	GGTGGAATTTACCCCACTACCTA
<i>TBL1XR1</i>	8	AACAACAAAGTAAGAAGGAAAATGC	TGGCACTCACAAGTAGGCAA
	10	CTGTTGCTTGGCTTCACCAG	AGCCTTGTGGTACTATTTGGGA
	10	GCAAGCTCCAGCTTTCACGTA	TAGCCTTGTGGTACTATTTGGGA
	10	AGCAAGCTCCAGCTTTCACG	AGCCTTGTGGTACTATTTGGGAT
	11	AGGTTTCTTACCGTATGTCCTTG	CTTTGTTCTTTGCAGCACC
	11	CTTACCGTATGTCCTTGAATGT	ACAATGGTTCAAAGCTAAAACTCT
	11	AGGTTTCTTACCGTATGTCCTTG	CTTTGTTCTTTGCAGCACC
	11	AGGTTTCTTACCGTATGTCCTTG	CTTTGTTCTTTGCAGCACCA
	14	ACATACCTGCGTGTTCCAGA	GCAAGGCTGGGGGAGTATTT
<i>B2M</i>	1	CTGGCTTGGAGACAGGTGAC	GACTCACGCTGGATAGCCTC
	2	GCTTGACACCAAGTTAGCCC	ATGTCGGATGGATGAAACCCA
	2	GTCTGGGTTTCATCCATCCGA	AAGTCACATGGTTCACACGGC
<i>PRDM1</i>	2	GTGGACAGAGGCTGAGTTTG	GGCAAGTAGGGAGATTTGGC
	2	TACATTGTGAACGACCACCCC	GGCAAGTAGGGAGATTTGGCA
	2	GTGGACAGAGGCTGAGTTTGA	AGGCCTCAAGGGCAAGTAG
	2	CCTGGGATTCTGGTGCTGAT	AGGCCTCAAGGGCAAGTAGG
	4	GCGCTATGTGAATCCAGCAC	GGGGCAGAACCGACATTACT
	4	CGCTATGTGAATCCAGCACAC	GTTCAAAGGGGCAGAACCGA
<i>PRKCD</i>	6	GCCAAGTTCCCAACGATGAA	CAAAGTGAGTGAGCGGGGAC
	15	GCATTTCTTGCTCCTGGAAGTG	GGATCCTGCTTGGAGCATTTCA
	17	GTCCCCCTTCCATGGTGAT	CTGCCATTCCAGAGACAGGAAG
<i>TOX</i>	1	GTGGAAACAAAAGCAGAGCGT	AGACACCTCACTCTGTTCCG
	5	GATTTTGGCCCTTGATGGCG	CCAAATTGTCTCAGTCCCCCT
	5	GATGGCGGCCTGAGTATCAC	GTCCCCAAATTGTCTCAGTCCC

Table 4 の続き

## 統計解析

各生存者において、0 日目は高齢者プロトコールによる治療が開始された日として定義した。

全生存期間 (overall survival: OS) は、0 日目から死亡した日 (死因は問わない) までの期間と定義し、無増悪生存期間 (progression free survival: PFS) は、0 日目から PCNSL の進行またはそれに伴って死亡した日までの期間として定義した。全てのデータは Easy R (EZR) で分析した<sup>32</sup>。

遺伝子変異および臨床因子が PFS または OS に及ぼす影響を調べるための単変量解析は、Wilcoxon 検定によって行った。

OS や PFS の独立した予測因子は、Cox の比例ハザードモデルによって多変量解析を行うことで分析し、結果はハザード比 (HR) および 95%信頼区間 (CI) として示した。

全ての計算において両側検定を施行し、全ての分析において  $p < 0.05$  を有意であると見なした。

## 2.3 結果

### 臨床検体

脳外科手術により切除された 48 症例の PCNSL 腫瘍組織及び骨髄を得ることができた。そのうち 1 症例においては HIV 感染が確認されたため除外とした。また、2 症例においては腫瘍組織から抽出した DNA を Qubit flourometric により測定したところ、十分な量の DNA を採取できなかったため除外した。残り 45 症例については手順に従ってライブラリー作製を行ったが、うち 3 症例においてはライブラリーの濃度が低かったため除外とした。最終的に、残り 42 症例に対して後方視的に解析を行った。

また、正常コントロールとして骨髄や口腔粘膜が使用可能だったのは症例中 25 症例であり、これらについては手順に従ってサンガーシーケンスを行い、腫瘍から検出された遺伝子変異が体細胞変異か生殖細胞系列変異か検証するために使用した。

本研究で収集された PCNSL は病理学的評価により全て DLBCL と診断された。方法の項で述べた通り、Hans の分類法を使用して遺伝子発現パターンの鑑別を行った結果、42 症例中 7 症例が GCB 型であり、35 症例が non-GCB 型であることが明らかとなった (Table 5, 6)。

ID	CD10	BCL6	MUM1	Hans
T1	-	-	+	non-GCB
T2	-	+	+	non-GCB
T4	-	-	+	non-GCB
T5	+	+	+	GCB
T6	+	+	+	GCB
T8	-	+	+	non-GCB
T9	-	+	+	non-GCB
TP5	-	-	+	non-GCB
TP7	-	+	+	non-GCB
TP12	-	+	+	non-GCB
TP15	-	+	+	non-GCB
TP17	-	+	+	non-GCB
TP18	-	+	+	non-GCB
TP23	-	+	+	non-GCB
TP25	-	+	+	non-GCB
TP26	-	+	+	non-GCB
TP28	-	+	+	non-GCB
TP29	-	+	+	non-GCB
TP31	-	+	+	non-GCB
TP35	+	+	+	GCB
TP36	-	+	+	non-GCB
TP37	-	+	+	non-GCB
TP39	-	+	+	non-GCB
TP41	-	+	+	non-GCB
TP42	-	+	+	non-GCB
TP43	-	-	+	non-GCB
TP44	-	+	+	non-GCB
TP46	-	-	+	non-GCB
TP48	-	+	+	non-GCB
TP49	-	+	+	non-GCB
TP51	-	+	+	non-GCB
TP52	+	+	+	GCB
TP53	+	+	+	GCB
TP54	+	+	+	GCB
TP57	-	+	+	non-GCB
TP71	+	+	+	GCB
TP72	-	+	+	non-GCB
TP77	-	+	+	non-GCB
TP79	-	+	+	non-GCB
TP80	-	+	+	non-GCB
TP82	-	+	+	non-GCB
TP83	-	+	+	non-GCB

Table 5 PCNSL の腫瘍組織標本に対する免疫染色の結果

GCB; germinal center B cell, Hans; Hans の分類

Sample ID	Age	Sex	Diagnosis	Hans	Germline Control	Status of DNA	Date of biopsy
T1	65	male	DLBCL	non-GCB	BM	Frozen tissue	2009/7/12
T2	68	male	DLBCL	non-GCB	BM	Frozen tissue	2010/9/22
T4	65	male	DLBCL	non-GCB	BM	Frozen tissue	2007/10/29
T5	72	female	DLBCL	GCB	BM	Frozen tissue	2008/9/12
T6	67	male	DLBCL	GCB	BM	Frozen tissue	2009/9/3
T8	69	male	DLBCL	non-GCB	BM	Frozen tissue	2012/6/5
T9	62	female	DLBCL	non-GCB	BM	Frozen tissue	2012/7/2
TP5	74	male	DLBCL	non-GCB		FFPE	2010/10/26
TP7	68	male	DLBCL	non-GCB		FFPE	2013/7/11
TP12	74	male	DLBCL	non-GCB		FFPE	2013/2/13
TP15	66	male	DLBCL	non-GCB		FFPE	2013/4/18
TP17	58	male	DLBCL	non-GCB	BM	FFPE	2013/5/15
TP18	63	male	DLBCL	non-GCB	BM	FFPE	2005/5/11
TP23	66	male	DLBCL	non-GCB	BM	FFPE	2014/3/27
TP25	76	male	DLBCL	non-GCB	BM	FFPE	2013/10/8
TP26	64	male	DLBCL	non-GCB		FFPE	2005/8/24
TP28	78	female	DLBCL	non-GCB	BM	FFPE	2014/11/25
TP29	72	female	DLBCL	non-GCB		FFPE	2015/1/6
TP31	78	male	DLBCL	non-GCB	BM	FFPE	2010/8/16
TP35	62	female	DLBCL	GCB	BM	FFPE	2009/4/6
TP36	76	male	DLBCL	non-GCB	BM	FFPE	2008/12/11

Table 6 PCNSL 患者の臨床情報

本研究における PCNSL 患者の臨床情報を示す。

BM; 骨髄 (Bone marrow), DLBCL; び漫性大細胞性 B 細胞リンパ腫 (DLBCL), FCP; frozen cell pellet, FFPE; Formalin- fixed paraffin-embedded, Germline control; 正常コントロール, GCB; germinal center B cell, Hans; Hans の分類

TP37	68	female	DLBCL	non-GCB		FFPE	2005/10/4
TP39	64	female	DLBCL	non-GCB	BM	FFPE	2005/8/2
TP41	68	female	DLBCL	non-GCB		FFPE	2011/5/3
TP42	62	female	DLBCL	non-GCB	BM	FFPE	2005/3/16
TP43	73	male	DLBCL	non-GCB	BM	FFPE	2006/5/9
TP44	61	female	DLBCL	non-GCB	BM	FFPE	2006/8/25
TP46	71	male	DLBCL	non-GCB	Buccal	FFPE	2008/1/18
TP48	65	male	DLBCL	non-GCB	BM	FFPE	2008/1/15
TP49	62	female	DLBCL	non-GCB	BM	FFPE	2009/9/24
TP51	74	male	DLBCL	non-GCB		FFPE	2011/5/26
TP52	70	male	DLBCL	GCB	Buccal	FFPE	2011/11/28
TP53	82	female	DLBCL	GCB		FFPE	2012/5/18
TP54	61	male	DLBCL	GCB	BM	FFPE	2012/6/25
TP57	80	male	DLBCL	non-GCB	BM	FFPE	2012/10/20
TP71	68	male	DLBCL	GCB		FFPE	2014/3/5
TP72	68	female	DLBCL	non-GCB		FFPE	2013/11/11
TP77	67	female	DLBCL	non-GCB		FFPE	2014/5/29
TP79	76	female	DLBCL	non-GCB		FFPE	2014/6/4
TP80	67	male	DLBCL	non-GCB		FFPE	2014/12/22
TP82	67	female	DLBCL	non-GCB		FFPE	2014/10/3
TP83	75	male	DLBCL	non-GCB		FFPE	2014/7/28

Table 6 の続き



## ターゲットリシーケンス解析

全症例における標的エクソン部分におけるシークエンス深度 (coverage)は 1901 (range, 776 – 3365 x)と遺伝子解析に十分な結果が得られた。その結果 42 症例中 38 症例(90.4%)において 1 種類以上の変異が検出された。なかでも特に、*MYD88* (67%), *CD79B* (43%), *TBL1XR1* (24%), *TNFAIP3* (12%)などの B 細胞受容体シグナル伝達経路、NF- $\kappa$ B シグナル伝達経路に関連する遺伝子において、高頻度に変異が認められ、また *B2M* (11.9%)のような免疫監視機構に関連する遺伝子や、*PRDM1* (24%), *TOX* (11.9%)などのような B 細胞成熟に関連する遺伝子の変異も認められた。更に、異常な体細胞超変異の対象として知られている *PIM1* (69%)の遺伝子変異についても高頻度で認められた (Figure 4, Table 7)。

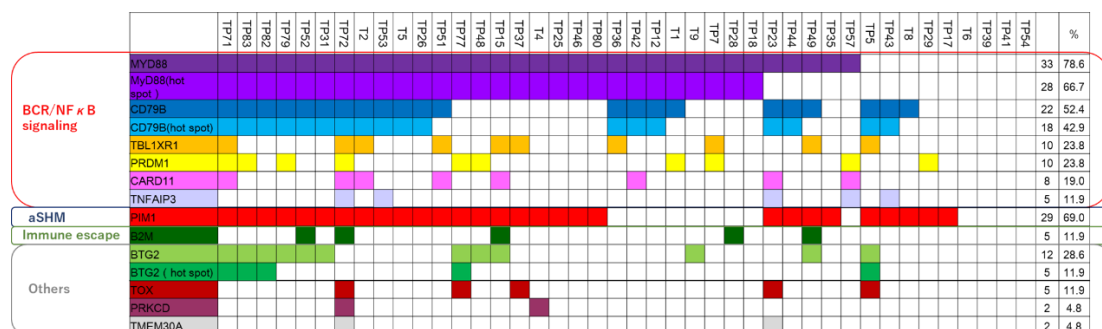


Figure 4 各 PCNSL 検体における体細胞変異数

ターゲットリシーケンスで代表的な 12 遺伝子を標的とした解析を行った。個々の症例で、変異が検出された遺伝子に色を付け、また遺伝子の機能ごとに分けて示した。なお、*MYD88*、*CD79B*、*BTG2* などの遺伝子については、hot spot における変異の有無についても同様に示した。

Sample ID	Annotated gene	Mutation type	RefSeq	Nucleotide change	Amino Acid Change	Variant Allele Frequency
TP15	<i>B2M</i>	nonsynonymous SNV	NM_004048	c.A1T	p.M1L	77.1
TP28	<i>B2M</i>	frameshift deletion	NM_004048	c.247_248del	p.Y83fs	24.1
TP49	<i>B2M</i>	frameshift deletion	NM_004048	c.37_38del	p.L13fs	44.3
TP49	<i>B2M</i>	stopgain	NM_004048	c.C90G	p.Y30X	44.8
TP52	<i>B2M</i>	frameshift insertion	NM_004048	c.93dupA	p.S31fs	38.6
TP72	<i>B2M</i>	nonsynonymous SNV	NM_004048	c.C215T	p.S72L	15.2
T9	<i>BTG2</i>	nonsynonymous SNV	NM_006763	c.G5A	p.S2N	30.9
T9	<i>BTG2</i>	nonsynonymous SNV	NM_006763	c.A107C	p.K36T	54.1
TP5	<i>BTG2</i>	nonsynonymous SNV	NM_006763	c.G133A	p.A45T	34.3
TP5	<i>BTG2</i>	nonsynonymous SNV	NM_006763	c.G162C	p.W54C	33.5
TP5	<i>BTG2</i>	frameshift deletion	NM_006763	c.255_264del	p.I85fs	32.3
TP5	<i>BTG2</i>	nonsynonymous SNV	NM_006763	c.G335C	p.R112P	32.6
TP5	<i>BTG2</i>	frameshift deletion	NM_006763	c.338delT	p.I113fs	32.5
TP15	<i>BTG2</i>	nonsynonymous SNV	NM_006763	c.C28T	p.L10F	48.3
TP15	<i>BTG2</i>	nonsynonymous SNV	NM_006763	c.C62G	p.S21C	47.7
TP15	<i>BTG2</i>	nonsynonymous SNV	NM_006763	c.G83T	p.G28V	47.7
TP31	<i>BTG2</i>	nonsynonymous SNV	NM_006763	c.G11T	p.G4V	43.5
TP31	<i>BTG2</i>	nonsynonymous SNV	NM_006763	c.G27A	p.M9I	43.6
TP31	<i>BTG2</i>	nonsynonymous SNV	NM_006763	c.C28T	p.L10F	36.7
TP31	<i>BTG2</i>	nonframeshift substitution	NM_006763	c.195_196GT	p.Y65X	29.8
TP31	<i>BTG2</i>	nonsynonymous SNV	NM_006763	c.G341C	p.G114A	27.7
TP31	<i>BTG2</i>	nonsynonymous SNV	NM_006763	c.C407G	p.T136S	46.2
TP31	<i>BTG2</i>	frameshift deletion	NM_006763	c.462_472del	p.M154fs	25.4
TP48	<i>BTG2</i>	nonsynonymous SNV	NM_006763	c.A152G	p.K51R	48.3
TP49	<i>BTG2</i>	frameshift deletion	NM_006763	c.354_376del	p.S118fs	15.6
TP52	<i>BTG2</i>	nonsynonymous SNV	NM_006763	c.C154T	p.H52Y	13.8
TP71	<i>BTG2</i>	frameshift deletion	NM_006763	c.255_264del	p.I85fs	13.2
TP71	<i>BTG2</i>	nonsynonymous SNV	NM_006763	c.G335C	p.R112P	16.9
TP71	<i>BTG2</i>	frameshift deletion	NM_006763	c.338delT	p.I113fs	15.8
TP77	<i>BTG2</i>	frameshift deletion	NM_006763	c.255_264del	p.I85fs	13.5
TP77	<i>BTG2</i>	nonsynonymous SNV	NM_006763	c.G335C	p.R112P	12.4
TP77	<i>BTG2</i>	frameshift deletion	NM_006763	c.338delT	p.I113fs	12.6
TP79	<i>BTG2</i>	nonsynonymous SNV	NM_006763	c.G92A	p.S31N	43.8
TP79	<i>BTG2</i>	nonsynonymous SNV	NM_006763	c.T356C	p.I119T	29.8
TP82	<i>BTG2</i>	frameshift deletion	NM_006763	c.255_264del	p.I85fs	12.3
TP82	<i>BTG2</i>	nonsynonymous SNV	NM_006763	c.G335C	p.R112P	12.6
TP82	<i>BTG2</i>	frameshift deletion	NM_006763	c.338delT	p.I113fs	13.0

Table 7 Ion Ampliseq による体細胞変異の確認

代表的な 12 遺伝子を標的とした解析をターゲットリシーケンスで行った。

frameshift deletion; フレームシフト欠失変異, frameshift insertion; フレームシフト挿入変異, nonframeshift substitution; フレームシフト以外の原因による塩基置換, nonframeshift deletion; フレームシフト以外の原因による欠失変異, nonsynonymous; 非同義変異, Ref Seq; 核酸データの Accession 番号 (reference sequencing), stop gain; 終止変異

Sample ID	Annotated gene	Mutation type	RefSeq	Nucleotide change	Amino Acid Change	Variant Allele Frequency
TP83	<i>BTG2</i>	nonsynonymous SNV	NM_006763	c.C58T	p.L20F	48.1
TP83	<i>BTG2</i>	nonsynonymous SNV	NM_006763	c.G335C	p.R112P	9.4
T2	<i>CARD11</i>	nonframeshift deletion	NM_032415	c.1030_1032del	p.344_344del	33.6
TP15	<i>CARD11</i>	nonsynonymous SNV	NM_032415	c.T538G	p.Y180D	24.8
TP15	<i>CARD11</i>	nonsynonymous SNV	NM_032415	c.C383T	p.T128M	21.5
TP23	<i>CARD11</i>	nonsynonymous SNV	NM_032415	c.A1240G	p.N414D	10.1
TP42	<i>CARD11</i>	nonsynonymous SNV	NM_032415	c.C383T	p.T128M	82.2
TP42	<i>CARD11</i>	nonsynonymous SNV	NM_032415	c.A293T	p.Y98F	79.4
TP51	<i>CARD11</i>	nonsynonymous SNV	NM_032415	c.G1876A	p.E626K	27.9
TP57	<i>CARD11</i>	nonsynonymous SNV	NM_032415	c.G1741A	p.A581T	41.9
TP71	<i>CARD11</i>	nonsynonymous SNV	NM_032415	c.C2801T	p.S934L	41.5
TP71	<i>CARD11</i>	nonsynonymous SNV	NM_032415	c.C2582T	p.T861I	10.8
TP71	<i>CARD11</i>	stopgain	NM_032415	c.C2539T	p.Q847X	14.0
TP72	<i>CARD11</i>	nonsynonymous SNV	NM_032415	c.C1838T	p.P613L	33.5
T1	<i>CD79B</i>	nonsynonymous SNV	NM_000626	c.C555A	p.D186E	27.0
T2	<i>CD79B</i>	nonsynonymous SNV	NM_000626	c.T586C	p.Y196H	32.5
T5	<i>CD79B</i>	nonsynonymous SNV	NM_000626	c.T586C	p.Y196H	52.6
T8	<i>CD79B</i>	nonsynonymous SNV	NM_000626	c.A590G	p.E197G	12.1
TP5	<i>CD79B</i>	nonsynonymous SNV	NM_000626	c.A587T	p.Y196F	61.7
TP12	<i>CD79B</i>	nonsynonymous SNV	NM_000626	c.A587C	p.Y196S	43.3
TP23	<i>CD79B</i>	nonsynonymous SNV	NM_000626	c.T586G	p.Y196D	30.0
TP26	<i>CD79B</i>	nonsynonymous SNV	NM_000626	c.T586G	p.Y196D	46.6
TP31	<i>CD79B</i>	nonsynonymous SNV	NM_000626	c.A587C	p.Y196S	37.1
TP36	<i>CD79B</i>	nonsynonymous SNV	NM_000626	c.A587C	p.Y196S	47.4
TP42	<i>CD79B</i>	nonsynonymous SNV	NM_000626	c.A587G	p.Y196C	39.6
TP43	<i>CD79B</i>	nonsynonymous SNV	NM_000626	c.T586G	p.Y196D	47.3
TP44	<i>CD79B</i>	nonsynonymous SNV	NM_000626	c.A587G	p.Y196C	48.9
TP49	<i>CD79B</i>	nonsynonymous SNV	NM_000626	c.G613C:	p.A205P	46.3
TP49	<i>CD79B</i>	nonsynonymous SNV	NM_000626	c.C68T	p.A23V	44.2
TP49	<i>CD79B</i>	nonsynonymous SNV	NM_000626	c.G557C	p.S186T	48.2
TP51	<i>CD79B</i>	nonsynonymous SNV	NM_000626	c.T596C	p.L199P	30.2
TP52	<i>CD79B</i>	nonsynonymous SNV	NM_000626	c.T586C	p.Y196H	29.2
TP52	<i>CD79B</i>	nonsynonymous SNV	NM_000626	c.C538A	p.L180M	15.0
TP52	<i>CD79B</i>	stopgain	NM_000626	c.C360G	p.Y120X	14.4
TP52	<i>CD79B</i>	nonsynonymous SNV	NM_000626	c.G224A	p.S75N	24.6
TP53	<i>CD79B</i>	nonsynonymous SNV	NM_000626	c.T586C	p.Y196H	57.0
TP71	<i>CD79B</i>	nonsynonymous SNV	NM_000626	c.T586C	p.Y196H	33.1
TP72	<i>CD79B</i>	nonsynonymous SNV	NM_000626	c.T586A	p.Y196N	37.1
TP79	<i>CD79B</i>	nonsynonymous SNV	NM_000626	c.A587G	p.Y196C	43.9
TP82	<i>CD79B</i>	nonsynonymous SNV	NM_000626	c.T586G	p.Y196D	23.9
TP83	<i>CD79B</i>	nonsynonymous SNV	NM_000626	c.T586G	p.Y196D	47.8
T1	<i>MYD88</i>	stoploss	NM_002468	c.T794C	p.L265P	24.2
T2	<i>MYD88</i>	stoploss	NM_002468	c.T794C	p.L265P	31.8
T4	<i>MYD88</i>	stoploss	NM_002468	c.T794C	p.L265P	49.2

Table 7 のつづき

Sample ID	Annotated gene	Mutation type	RefSeq	Nucleotide change	Amino Acid Change	Variant Allele Frequency
T5	<i>MYD88</i>	stoploss	NM_002468	c.T794C	p.L265P	44.2
T9	<i>MYD88</i>	stoploss	NM_002468	c.T794C	p.L265P	34.1
TP7	<i>MYD88</i>	stoploss	NM_002468	c.T794C	p.L265P	28.8
TP12	<i>MYD88</i>	stoploss	NM_002468	c.T794C	p.L265P	40.0
TP15	<i>MYD88</i>	stoploss	NM_002468	c.T794C	p.L265P	45.8
TP18	<i>MYD88</i>	stoploss	NM_002468	c.T794C	p.L265P	84.7
TP25	<i>MYD88</i>	stoploss	NM_002468	c.T794C	p.L265P	24.2
TP26	<i>MYD88</i>	stoploss	NM_002468	c.T794C	p.L265P	30.6
TP28	<i>MYD88</i>	stoploss	NM_002468	c.T794C	p.L265P	22.8
TP31	<i>MYD88</i>	stoploss	NM_002468	c.T794C	p.L265P	38.2
TP35	<i>MYD88</i>	nonsynonymous SNV	NM_002468	c.G728A	p.S243N	76.5
TP36	<i>MYD88</i>	stoploss	NM_002468	c.T794C	p.L265P	69.2
TP37	<i>MYD88</i>	stoploss	NM_002468	c.T794C	p.L265P	52.2
TP42	<i>MYD88</i>	stoploss	NM_002468	c.T794C	p.L265P	39.2
TP44	<i>MYD88</i>	stopgain	NM_002468	c.C773T	p.P258L	28.0
TP46	<i>MYD88</i>	stoploss	NM_002468	c.T794C	p.L265P	36.5
TP48	<i>MYD88</i>	stoploss	NM_002468	c.T794C	p.L265P	43.1
TP49	<i>MYD88</i>	stopgain	NM_002468	c.C773T	p.P258L	44.6
TP51	<i>MYD88</i>	stoploss	NM_002468	c.T794C	p.L265P	34.5
TP52	<i>MYD88</i>	stoploss	NM_002468	c.T794C	p.L265P	39.2
TP53	<i>MYD88</i>	stoploss	NM_002468	c.T794C	p.L265P	44.3
TP57	<i>MYD88</i>	nonsynonymous SNV	NM_002468	c.T695C	p.M232T	49.1
TP71	<i>MYD88</i>	nonsynonymous SNV	NM_001172567	c.G707A	p.G236E	12.4
TP71	<i>MYD88</i>	stoploss	NM_002468	c.T794C	p.L265P	9.2
TP72	<i>MYD88</i>	stoploss	NM_002468	c.T794C	p.L265P	25.6
TP72	<i>MYD88</i>	stopgain	NM_002468	c.C867G	p.Y289X	11.8
TP72	<i>MYD88</i>	nonsynonymous SNV	NM_002468	c.C874T	p.P292S	12.8
TP77	<i>MYD88</i>	stoploss	NM_002468	c.T794C	p.L265P	34.3
TP79	<i>MYD88</i>	stoploss	NM_002468	c.T794C	p.L265P	60.7
TP80	<i>MYD88</i>	stoploss	NM_002468	c.T794C	p.L265P	51.5
TP82	<i>MYD88</i>	stoploss	NM_002468	c.T794C	p.L265P	46.6
TP83	<i>MYD88</i>	stoploss	NM_002468	c.T794C	p.L265P	63.9
T2	<i>PIM1</i>	nonsynonymous SNV	NM_002648	c.A158C	p.Y53S	43.9
T2	<i>PIM1</i>	nonsynonymous SNV	NM_002648	c.C202G	p.H68D	35.3
T2	<i>PIM1</i>	nonsynonymous SNV	NM_002648	c.G290C	p.S97T	31.0
T2	<i>PIM1</i>	nonsynonymous SNV	NM_002648	c.T308G	p.V103G	30.7
T2	<i>PIM1</i>	nonsynonymous SNV	NM_002648	c.C379G	p.Q127E	30.6
T4	<i>PIM1</i>	nonsynonymous SNV	NM_002648	c.G285T	p.K95N	79.5
T5	<i>PIM1</i>	nonframeshift deletion	NM_002648	c.377_379del	p.126_127del	87.1
T8	<i>PIM1</i>	nonsynonymous SNV	NM_002648	c.C202A	p.H68N	9.2
TP5	<i>PIM1</i>	nonsynonymous SNV	NM_002648	c.C886T	p.P296S	31.0
TP5	<i>PIM1</i>	nonsynonymous SNV	NM_002648	c.C896T	p.T299I	30.7
TP15	<i>PIM1</i>	nonsynonymous SNV	NM_002648	c.G237C	p.E79D	28.6

Table 7 のつづき

Sample ID	Annotated gene	Mutation type	RefSeq	Nucleotide change	Amino Acid Change	Variant Allele Frequency
TP15	<i>PIM1</i>	nonsynonymous SNV	NM_002648	c.G437A	p.S146N	29.7
TP15	<i>PIM1</i>	nonsynonymous SNV	NM_002648	c.C490G	p.L164V	23.3
TP17	<i>PIM1</i>	nonsynonymous SNV	NM_002648	c.G365A	p.R122K	77.3
TP23	<i>PIM1</i>	nonsynonymous SNV	NM_002648	c.C224A	p.S75Y	24.6
TP23	<i>PIM1</i>	nonsynonymous SNV	NM_002648	c.G296A	p.G99D	25.9
TP23	<i>PIM1</i>	nonsynonymous SNV	NM_002648	c.G154T	p.V52F	14.8
TP25	<i>PIM1</i>	nonsynonymous SNV	NM_002648	c.G210C	p.E70D	16.3
TP25	<i>PIM1</i>	nonsynonymous SNV	NM_002648	c.C373T	p.P125S	33.6
TP25	<i>PIM1</i>	stopgain	NM_002648	c.G403T	p.E135X	34.8
TP25	<i>PIM1</i>	nonframeshift deletion	NM_002648	c.426_461del	p.142_154del	34.7
TP26	<i>PIM1</i>	nonsynonymous SNV	NM_002648	c.A397G	p.I133V	43.2
TP26	<i>PIM1</i>	nonsynonymous SNV	NM_002648	c.C427G	p.L143V	43.4
TP26	<i>PIM1</i>	stopgain	NM_002648	c.G447A	p.W149X	39.8
TP26	<i>PIM1</i>	nonsynonymous SNV	NM_002648	c.G451A	p.V151M	39.7
TP29	<i>PIM1</i>	nonsynonymous SNV	NM_002648	c.C259T	p.P87S	26.1
TP29	<i>PIM1</i>	nonsynonymous SNV	NM_002648	c.G286T	p.V96L	38.1
TP31	<i>PIM1</i>	nonsynonymous SNV	NM_002648	c.G641A	p.R214H	83.2
TP31	<i>PIM1</i>	nonsynonymous SNV	NM_002648	c.C721G	p.P241A	88.5
TP31	<i>PIM1</i>	nonsynonymous SNV	NM_002648	c.G757A	p.V253I	87.1
TP35	<i>PIM1</i>	nonsynonymous SNV	NM_002648	c.G437A	p.S146N	43.1
TP37	<i>PIM1</i>	nonsynonymous SNV	NM_002648	c.C127G	p.L43V	96.9
TP37	<i>PIM1</i>	nonsynonymous SNV	NM_002648	c.G208A	p.E70K	19.3
TP37	<i>PIM1</i>	nonsynonymous SNV	NM_002648	c.G286A	p.V96M	19.0
TP37	<i>PIM1</i>	nonsynonymous SNV	NM_002648	c.C373T	p.P125S	18.9
TP37	<i>PIM1</i>	nonsynonymous SNV	NM_002648	c.C373G	p.P125A	76.8
TP37	<i>PIM1</i>	stopgain	NM_002648	c.C379T	p.Q127X	19.7
TP37	<i>PIM1</i>	nonsynonymous SNV	NM_002648	c.G686A	p.G229E	48.7
TP37	<i>PIM1</i>	nonframeshift substitution	NM_002648	c.870_871AT	p.Q291X	44.8
TP43	<i>PIM1</i>	nonsynonymous SNV	NM_002648	c.C373T	p.P125S	59.6
TP44	<i>PIM1</i>	frameshift deletion	NM_002648	c.173_179del	p.V58fs	34.7
TP44	<i>PIM1</i>	nonsynonymous SNV	NM_002648	c.C373T	p.P125S	11.4
TP46	<i>PIM1</i>	nonsynonymous SNV	NM_002648	c.G164A	p.G55D	29.6
TP46	<i>PIM1</i>	nonsynonymous SNV	NM_002648	c.G290C	p.S97T	22.2
TP48	<i>PIM1</i>	nonsynonymous SNV	NM_002648	c.G193C	p.A65P	45.4
TP48	<i>PIM1</i>	nonsynonymous SNV	NM_002648	c.G235C	p.E79Q	36.7
TP48	<i>PIM1</i>	stopgain	NM_002648	c.C379T	p.Q127X	76.4
TP49	<i>PIM1</i>	nonsynonymous SNV	NM_002648	c.G295A	p.G99S	84.4
TP51	<i>PIM1</i>	nonsynonymous SNV	NM_002648	c.C259T	p.P87S	55.2
TP51	<i>PIM1</i>	nonsynonymous SNV	NM_002648	c.C291G	p.S97R	87.1
TP51	<i>PIM1</i>	nonsynonymous SNV	NM_002648	c.G327C	p.W109C	86.6
TP51	<i>PIM1</i>	nonsynonymous SNV	NM_002648	c.C373T	p.P125S	85.5
TP51	<i>PIM1</i>	nonsynonymous SNV	NM_002648	c.G437A	p.S146N	60.9
TP52	<i>PIM1</i>	nonsynonymous SNV	NM_002648	c.G172T	p.V58F	61.6

Table 7 のつづき

Sample ID	Annotated gene	Mutation type	RefSeq	Nucleotide change	Amino Acid Change	Variant Allele Frequency
TP52	<i>PIM1</i>	nonsynonymous SNV	NM_002648	c.G208A	p.E70K	19.3
TP52	<i>PIM1</i>	nonsynonymous SNV	NM_002648	c.G237C	p.E79D	22.8
TP52	<i>PIM1</i>	nonsynonymous SNV	NM_002648	c.C302G	p.S101C	34.6
TP52	<i>PIM1</i>	nonframeshift substitution	NM_002648	c.326_327AA	p.W109X	35.1
TP52	<i>PIM1</i>	nonsynonymous SNV	NM_002648	c.G409A	p.G137R	35.9
TP52	<i>PIM1</i>	nonsynonymous SNV	NM_002648	c.C454A	p.L152M	18.2
TP53	<i>PIM1</i>	nonframeshift deletion	NM_002648	c.377_379del	p.126_127del	83.6
TP71	<i>PIM1</i>	nonsynonymous SNV	NM_002648	c.G210C	p.E70D	13.0
TP71	<i>PIM1</i>	nonsynonymous SNV	NM_002648	c.C427G	p.L143V	16.8
TP72	<i>PIM1</i>	nonsynonymous SNV	NM_002648	c.G286A	p.V96M	24.0
TP72	<i>PIM1</i>	nonsynonymous SNV	NM_002648	c.G935A	p.S312N	65.7
TP77	<i>PIM1</i>	nonsynonymous SNV	NM_002648	c.G210C	p.E70D	21.5
TP77	<i>PIM1</i>	nonsynonymous SNV	NM_002648	c.G451A	p.V151M	46.0
TP77	<i>PIM1</i>	nonsynonymous SNV	NM_002648	c.C490T	p.L164F	42.9
TP77	<i>PIM1</i>	nonsynonymous SNV	NM_002648	c.C793T	:p.H265Y	39.0
TP79	<i>PIM1</i>	nonsynonymous SNV	NM_002648	c.T151C	p.S51P	50.4
TP80	<i>PIM1</i>	nonsynonymous SNV	NM_002648	c.G137A	p.S46N	22.4
TP82	<i>PIM1</i>	nonsynonymous SNV	NM_002648	c.G437C	p.S146T	26.3
TP83	<i>PIM1</i>	stopgain	NM_002648	c.G403T	p.E135X	11.2
TP83	<i>PIM1</i>	nonframeshift deletion	NM_002648	c.426_461del	p.142_154del	15.0
T1	<i>PRDM1</i>	stopgain	NM_001198	c.C529T	p.Q177X	39.9
TP7	<i>PRDM1</i>	stopgain	NM_001198	c.C1816T	p.Q606X	31.7
TP29	<i>PRDM1</i>	nonsynonymous SNV	NM_001198	c.C236T	p.A79V	52.4
TP48	<i>PRDM1</i>	frameshift deletion	NM_001198	c.284_291del	p.S95fs	47.7
TP57	<i>PRDM1</i>	nonsynonymous SNV	NM_001198	c.G220A	p.G74S	51.4
TP71	<i>PRDM1</i>	nonsynonymous SNV	NM_001198	c.C988T	p.P330S	15.5
TP72	<i>PRDM1</i>	nonsynonymous SNV	NM_001198	c.C1225T	p.H409Y	9.8
TP72	<i>PRDM1</i>	nonsynonymous SNV	NM_001198	c.C1838T	p.T613I	14.4
TP72	<i>PRDM1</i>	nonsynonymous SNV	NM_001198	c.G1880T	p.G627V	9.9
TP77	<i>PRDM1</i>	stopgain	NM_001198	c.C1756T	p.Q586X	43.5
TP79	<i>PRDM1</i>	stopgain	NM_001198	c.C673T	p.Q225X	91.9
TP83	<i>PRDM1</i>	nonsynonymous SNV	NM_001198	c.G26A	p.R9H	80.7
TP83	<i>PRDM1</i>	frameshift deletion	NM_001198	c.1042_1043del	p.K348fs	81.9
T4	<i>PRKCD</i>	nonsynonymous SNV	NM_006254	c.G1363A	p.A455T	88.7
TP72	<i>PRKCD</i>	nonsynonymous SNV	NM_006254	c.C1696A	p.H566N	9.6
TP72	<i>PRKCD</i>	nonsynonymous SNV	NM_006254	c.G515A	p.C172Y	11.0
TP72	<i>PRKCD</i>	nonsynonymous SNV	NM_006254	c.A936G	:p.I312M	12.9
T2	<i>TBL1XR1</i>	nonsynonymous SNV	NM_024665	c.T1044A	p.H348Q	29.4
TP5	<i>TBL1XR1</i>	nonsynonymous SNV	NM_024665	c.G740A	p.G247E	31.5
TP7	<i>TBL1XR1</i>	nonsynonymous SNV	NM_024665	c.A1337G	p.Y446C	30.2
TP15	<i>TBL1XR1</i>	nonsynonymous SNV	NM_024665	c.A1058G	p.N353S	41.4
TP36	<i>TBL1XR1</i>	nonsynonymous SNV	NM_024665	c.T1381C	p.S461P	39.1
TP37	<i>TBL1XR1</i>	nonsynonymous SNV	NM_024665	c.T1096C	p.S366P	45.3
TP37	<i>TBL1XR1</i>	nonsynonymous SNV	NM_024665	c.C926T	p.A309V	49.4

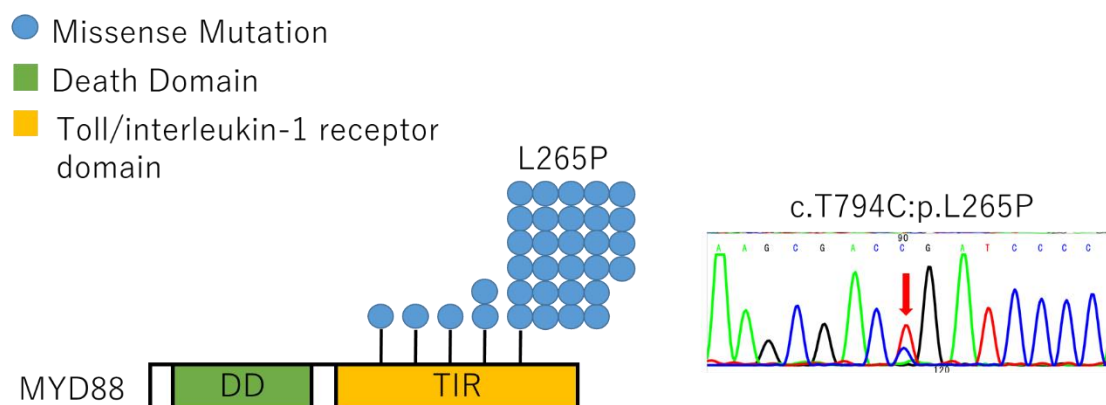
Table 7 のつづき

Sample ID	Annotated gene	Mutation type	RefSeq	Nucleotide change	Amino Acid Change	Variant Allele Frequency
TP49	<i>TBL1XR1</i>	nonsynonymous SNV	NM_024665	c.C869G	p.T290R	91.3
TP51	<i>TBL1XR1</i>	nonsynonymous SNV	NM_024665	c.A920G	p.H307R	31.6
TP71	<i>TBL1XR1</i>	frameshift deletion	NM_024665	c.322_352del	p.A108fs	31.8
TP72	<i>TBL1XR1</i>	stopgain	NM_024665	c.G1406A	p.W469X	17.5
TP72	<i>TBL1XR1</i>	nonsynonymous SNV	NM_024665	c.G1082A	p.G361D	11.7
TP72	<i>TBL1XR1</i>	nonsynonymous SNV	NM_024665	c.C152T	p.S51F	10.9
TP23	<i>TMEM30A</i>	nonsynonymous SNV	NM_018247	c.T160C	p.F54L	12.7
TP72	<i>TMEM30A</i>	nonsynonymous SNV	NM_018247	c.C716T	p.P239L	9.2
TP72	<i>TMEM30A</i>	nonsynonymous SNV	NM_018247	c.C397T	p.R133C	13.6
TP23	<i>TNFAIP3</i>	nonsynonymous SNV	NM_006290	c.C1084A	p.Q362K	15.2
TP43	<i>TNFAIP3</i>	frameshift deletion	NM_006290	c.2268delC	p.D756fs	97.5
TP53	<i>TNFAIP3</i>	nonsynonymous SNV	NM_006290	c.G301A	p.G101S	36.0
TP57	<i>TNFAIP3</i>	nonsynonymous SNV	NM_006290	c.T380G	p.F127C	48.1
TP72	<i>TNFAIP3</i>	nonsynonymous SNV	NM_006290	c.G451A	p.E151K	9.2
TP72	<i>TNFAIP3</i>	nonsynonymous SNV	NM_006290	c.C1954G	p.Q652E	11.6
TP5	<i>TOX</i>	nonsynonymous SNV	NM_014729	c.C1505A	p.P502Q	48.6
TP23	<i>TOX</i>	nonsynonymous SNV	NM_014729	c.C748A	p.P250T	27.0
TP37	<i>TOX</i>	frameshift deletion	NM_014729	c.32_36del	p.Q11fs	51.9
TP72	<i>TOX</i>	nonsynonymous SNV	NM_014729	c.C1037T	p.S346F	9.8
TP72	<i>TOX</i>	nonsynonymous SNV	NM_014729	c.C328T	p.P110S	10.9
TP77	<i>TOX</i>	nonframeshift deletion	NM_014729	c.65_82del	p.22_28del	34.1

Table 7 のつづき

## PCNSL では高頻度に *MYD88* L265P 変異を認める

*MYD88* 遺伝子のホットスポット部位である 265 番目のロイシンがプロリンに置換される変異 (*MYD88*L265P 変異)は 67%と高頻度に認められた (Figure 5)。*MYD88* 分子は、Toll/interleukin-1 receptor (TIR) に結合するアダプター蛋白であり NF- $\kappa$ B 経路を活性化する。近年、*MYD88*L265P は TIR domain という機能ドメインにおける変異であり、こちらが NF- $\kappa$ B 経路の恒常的活性化を誘導し、B 細胞の腫瘍化に関与する遺伝子変異であることが報告された<sup>33</sup>。



**Figure 5** *MYD88* のタンパク質構造と変異箇所

NF  $\kappa$  B 経路関連遺伝子である *MYD88* のタンパク質構造及び、本研究で PCNSL において同定された変異の箇所を示す。TIR ドメイン (Toll/interleukin-1 receptor domain) と Death ドメインに分かれており、本研究で認められた変異は全て TIR ドメイン内から検出された。



*MYD88*L265P は予後と有意に関連する

観察期間中央値は 26 カ月 (range, 1–105 months)で、3 年 OS は 46%、3 年 PFS は 26%であった。

これらの遺伝子変異や臨床因子が予後に与える影響について調べたところ、単変量解析では、年齢> 75 歳( $P = 0.0105$ )および精神活動の変化( $P = 0.0202$ ) (Table 8)は OS との有意な負の相関が認められた。

さらに、*MYD88*L265P 変異 ( $P = 0.127$ )、CrCl> 90mL /分 ( $P = 0.124$ ) および脳深部構造における病変形成 ( $P = 0.0649$ ) は、統計的に有意ではないものの、不良な予後に関連する傾向が確認された (Figure 6)。

多変量 Cox 回帰分析で調整した場合、*MYD88* L265P 変異は、有意な予後不良因子として残った (ハザード比 (HR)、2.903; 95%信頼区間 (CI)、1.013-8.323、 $P = 0.0474$ ) (Table 9)。

PFS に関して、CrCl> 90ml /分 ( $P = 0.0286$ ) および意識障害 ( $P = 0.00473$ ) が PFS との負の相関が有意に認められた (Table 8)。*MYD88*L265P 変異 ( $P = 0.0872$ , Table 8) は有意ではなかったものの、同変異陽性患者は陰性患者と比較すると PFS が低下する傾向が認められた (Figure 6)。

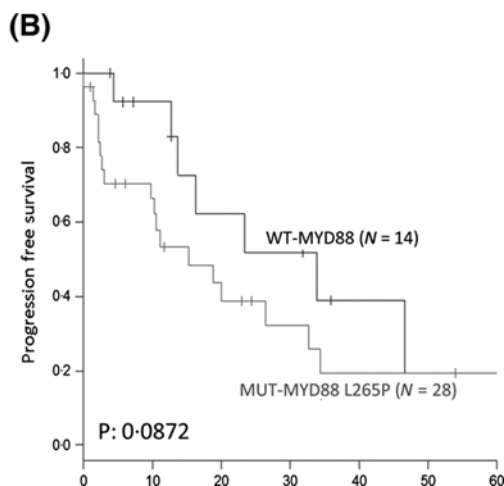
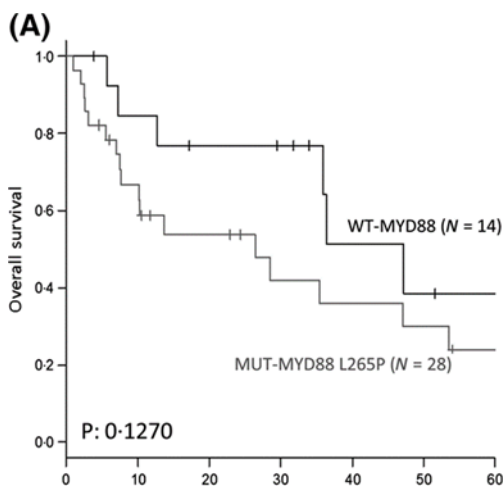
多変量 Cox 回帰分析で調整した場合、*MYD88*L265P 変異 ( $P = 0.0303$ ) は、より高い増悪リスクと有意に関連していた (Table 9)。

	P value	
	OS	PFS
<i>MyD88</i> (hot spot)	0.1270	0.0872
<i>BTG2</i> (hot spot)	0.8420	0.3140
<i>CD79B</i> (hot spot)	0.2310	0.2180
<i>PRDM1</i>	0.8990	0.3940
<i>TBL1XR1</i>	0.4860	0.2480
<i>PIM1</i>	0.3040	0.4580
<i>CARD11</i>	0.5280	0.4770
<i>PRKCD</i>	0.2150	0.6530
<i>TNFAIP3</i>	0.3530	0.9620
<i>B2M</i>	0.7520	0.4590
<i>TMEM30A</i>	0.9950	0.9510
<i>TOX</i>	0.6820	0.8000
Hans classification(GCB-NONGCB)	0.2420	0.4270
Age>75	0.0105	0.1930
Sex	0.6760	0.2340
KPS<70	0.1790	0.2080
Number of lesions	0.3520	0.4600
Involvement of deep brain	0.0649	0.2960
LDH	0.4410	0.9100
CrCl>90	0.1240	0.0286
Altered mentation	0.0202	0.0473
Hemiparesis	0.1930	0.9280

Table 8 PCNSL の予後因子に対する単変量解析の結果

遺伝子変異および臨床因子が PFS または OS に及ぼす影響を調べるための単変量解析を、Wilcoxon 検定により行った。

尚、多変量解析に含めた項目は赤で表示した。



**Figure 6 PCNSL における *MYD88* L265P 変異の予後への影響.**

(A)OS および(B)PFS を示す。有意差は認めなかったものの、*MYD88* L265P 変異 (MUT-*MYD88* L265P) を有する PCNSL 患者は、野生型 (WT-*MYD88*) の PCNSL 患者と比較して OS および PFS が不良となる傾向を認めた。

	OS		PFS	
	HR (95%CI)	P value	HR (95%CI)	P value
Altered mental activity	4.729 (1.522-14.700)	0.0072	2.210 (0.89-5.486)	0.0875
CrCl >90 ml/min	1.672 (0.6496-4.304)	0.2865	2.477 (0.9973-6.152)	0.0507
<i>MYD88</i> L265P	2.903 (1.013-8.323)	0.0474	2.770 (1.102-6.966)	0.0303
Age >75 years	2.738 (0.8014-9.352)	0.1081		
Deep brain involvement	1.841 (0.674-5.031)	0.2338		

**Table 9 PCNSL における予後不良因子に対する多変量解析の結果.**

Altered mental activity; 意識障害, CI; 信頼区間 (confidence interval), Deep brain involvement; 脳深部構造における病変形成 HR; ハザード比 (hazard ratio), IPI; 国際予後指数 (international prognostic index), OS; 全生存率 (overall survival), PFS; 無増悪生存率 (progression-free survival), CrCl; クレアチニンクリアランス (creatinine clearance)

## 2.4 考察

この研究により、*MYD88* L265P 変異が PCNSL の予後と関連している可能性があることを示した。*MYD88* L265P 変異の医学的、生物学的な意義については全身性の DLBCL に関する既報を基に考察することができる。DLBCL の病理所見における形態学的な特徴と *MYD88* L265P 変異との関連を示す報告は今のところ確認されていないが、B 細胞分化段階を示唆する遺伝子発現パターンから GCB type と non-GCB type に分けた場合、前者では殆ど *MYD88* L265P の発現が認められないのに対して、後者では 30~40%程度で発現を認めるという違いがある<sup>17</sup>。一方で、PCNSL において *MYD88* L265P 変異による遺伝子発現パターンに与えられる影響が全身性の DLBCL のそれと同様のものか否かを確認するために、Hans の基準に則って、免疫染色の結果に基づいて分類を行った (Table 5)<sup>14</sup>。結果、Systemic な DLBCL で認められるような、*MYD88*L265P と non-GCB type との有意な相関は確認できなかった (Table 10)。Hans の分類を行うにあたって、CD10、BCL 6、MUM1 の免疫染色を施行しているが、これらの各々の所見と *MYD88* L265P でも有意な関連は確認できなかった。Systemic DLBCL では GCB type には殆ど *MYD88*L265P は認められないとされているが<sup>17</sup>、本研究においては、PCNSL42 症例の内、GCB type に分類されたのは 7 症例で、うち 4 症例において *MYD88* L265P 変異が陽性であった。

BTG2	0.224
CD79B	0.1348
CD79B(hot spot)	0.204
PRDM1	0.1581
TBL1XR1	0.1581
PIM1	0.073
CARD11	0.085
PRKCD	0.1581
TNFAIP3	-0.2079
B2M	0.225
TMEM30A	-0.079
TOX	-0.052
Hans classification(GCB-NONGCB)	0.09
Age > 75	0.239
Sex	0.069
KPS < 70	-0.236
Number of lesions	0.034
Involvement of deep brain	-0.111
LDH	-0.117
CCr > 90	-0.137
Altered mentation	-0.202
Hemiparesis	-0.169

Table 10 *MYD88* L265P とその他のパラメーターとの相関係数 (Spearman の相関係数)

ノンパラメトリックな 2 つの変数の間に、単純増加や単純減少の関係がどの程度存在するかを、順位データを基に数値で表す指標である Spearman の相関係数を使用した。

Systemic DLBCL と PCNSL の腫瘍病理を比較すると周囲の免疫細胞が PCNSL においては乏しいという報告もあり<sup>34-35</sup>、そもそもこれら二つの腫瘍の置かれている免疫環境が違うことも考えると、*MYD88* L265P と Hans の分類の際に用いた CD10、BCL6、MUM1 などの発現パターンとの相関関係が、systemic な DLBCL と PCNSL との間で異なっている可能性が考えられる。この点については、研究 3 の考察の部分で詳述する。

予後の観点から見ると、*MYD88* 変異は皮膚原発びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫-下肢型や DLBCL, NOS の不良な予後とも関連することが報告されているので、この点で *MYD88* L265P 変異に注目することは特に興味深い<sup>31, 36</sup>。このことから、クリニカルシーケンスの重要性が示唆された。最近、Pastore らの研究で、濾胞性リンパ腫で確認された 7 つのタイプの遺伝子変異の有無を、既存の濾胞性リンパ腫国際予後指標 (FLIPI) に組み合わせることで、m7-FLIPI という新しい予後アルゴリズムが提案され、こちらに基づいたリスク階層化が行われた。このアルゴリズムは FLIPI 単独よりも優れていることが示されていた<sup>37</sup>。同様に、PCNSL の改善された予後アルゴリズムは、遺伝子の変異状態を臨床パラメーターと組み合わせることによって、将来的に発展させていく必要がある。

最近のシグナル伝達の研究で、non-GCB-DLBCL の患者、特に *MYD88* および CD79A / B 変異の両方を有する患者において、Bruton チロシンキナーゼ阻害剤である ibrutinib が高い有効性を示すことが報告され、<sup>38</sup> さらには B 細胞リンパ腫の CNS 再発に対する ibrutinib の有効性が示された<sup>39</sup>。Ibrutinib の PCNSL 患者への有用性について検証した臨床試験に関する報告も散見されており、特に再発難治の PCNSL に対して 50~77%もの高い奏効率が得られてい

る<sup>40-41</sup>。これは、再発難治の non-GCB タイプ DLBCL に対する奏効率（37%）<sup>38</sup>よりも有意に高く、PCNSL における *MYD88* 変異をターゲットとした治療の重要性を示唆する結果と考えられる。その一方で、iburutinib による加療を行った後の平均の無再発生存期間は 5 カ月程度とする報告も確認されていることから<sup>41</sup>、まだ今後も更なる臨床研究を重ねていき、iburutinib の有用性について確認する必要がある<sup>42</sup>。

これらの発見からは、*MYD88*L265P 変異が PCNSL において認められる様々な遺伝子変化の中でも特に主要な役割を担う可能性があることが示唆された。今後、PCNSL のクリニカルシーケンスにおける *MYD88* L265P 変異の有用性についての新たな展望が開かれることが期待される。実際に、*MYD88*L265P 変異が PCNSL 患者の不良な OS や PFS と関連することを示すためには、validation を行う必要があり、そのためには更に症例数を増やした状態で改めて解析を行う必要があると考えられる。

### 3. PCNSL における cell-free DNA 中の疾患特異的 *MYD88* 変異の臨床的意義

#### 3.1 背景

原発性中枢神経系リンパ腫（PCNSL）の患者は、適切な診断のために開頭生検や穿頭生検などの侵襲的外科的処置を受けなくてはならない。しかし、PCNSL の組織学的診断は、脳の深部に病変形成していることが多く、診断目的での生検が困難となることが少なくない。したがって、PCNSL の診断の助けとなるような、より信頼性があり、かつ侵襲性の低いバイオマーカー検出方法が必要とされている。

近年、非侵襲的診断のための材料として、腫瘍細胞のアポトーシス過程を経て放出される断片化された DNA である cell-free DNA が注目されている<sup>27</sup>。Cell-free DNA の歴史は、Mandel らによって 1948 年に健常人の血液から発見されたことに端を発する<sup>43</sup>。アポトーシスにより放出された DNA 断片であり、長さは通常の DNA と違い 145~170bp 程度で、半減期は 114 分程度と報告されている<sup>44</sup>。固形癌および血液悪性腫瘍の両方の患者における cell-free DNA を検出するために、これらの腫瘍において同定された多くの遺伝子変異の解析結果が使用されており、臨床的有用性を示す研究結果が多数報告されている<sup>27, 45-46</sup>。cell-free DNA は濃度と腫瘍体積が強い相関を示すと言われており、ステージ II-IV



の 非小細胞肺癌患者の 100%、ステージ I の患者の 50%で検出され、進行がんだけで考えると感度 73%、特異度は 96%との報告がある<sup>47</sup>。このことから、治療開始後のモニタリングや診断ツールとしての有用性に期待が寄せられており、過去に大腸癌や胃がんの患者における cell-free DNA を用いた術後フォローアップに関する有用性が報告されている。Hamakawa らは、p53 遺伝子の異常が確認された胃がんの外科手術症例において、術前に採取された cell-free DNA に p53 遺伝子変異を検索し、経過中のそれらの定量値の推移と臨床所見との間に相関が認められたと報告している<sup>48</sup>。Sholer らの報告によると、次世代シーケンサーを用いた大腸がん原発巣の解析にて確認された遺伝子変異をターゲットとした cell-free DNA の解析が行われた結果、全再発症例において画像検査による再発診断に先立って cell-free DNA から遺伝子異常が検出されており、更に肉眼的根治切除が行われた症例では、再発症例の約 60%において術後に cell-free DNA が一旦は陰性化した後に、3 か月以内に陽性化している<sup>49</sup>。このように、病態進行や治療の過程における耐性獲得などを確認するためのバイオマーカーとしての有用性を挙げることができる。

Cell-free DNA に対して今後期待されているのは、癌の早期診断への応用であるが、その有用性についての報告は限られている。腫瘍の発症に関わる遺伝子異常を同定し、それを cell-free DNA 中に検出することができれば、血液検査でス

クリーニングを行うことができる可能性がある。

その一方で、近年様々な研究グループにより、PCNSL に対する全エクソシーケンスやターゲットリシーケンスによる解析を通じて、PCNSL の遺伝子プロファイルが明らかにされてきた。注目すべきことに、NF- $\kappa$ B および B 細胞受容体シグナル伝達経路に関連する遺伝子の変異は、PCNSL において非常に頻繁に認められる<sup>22-23, 25-26, 29, 50-51</sup>。特に、*MYD88* L265P 変異は、PCNSL 患者の 38%-85.4%において検出されているが、逆に非血液学的脳腫瘍の患者では全く同変異は検出されていない<sup>51</sup>。この違いは、*MYD88* L265P 変異が中枢神経系 (CNS) 腫瘍の PCNSL の鑑別診断に有用であることを示唆している。

そこで、本研究においては治療前および治療経過の中で PCNSL 患者の血清から採取した cell free DNA において、*MYD88* L265P 変異がどの程度の感度で検出されるかを確認すべく、解析を行った。

### 3.2 材料と方法

#### 臨床検体

2014 年 4 月から 2017 年 6 月までに、PCNSL と診断された 30 人の患者が筑波大学附属病院の臨床記録で同定された。うち 5 人は、研究 1 の対象となった患者である。治療前の脳腫瘍または血清サンプルを入手できなかった 16 人の患者（研究 1 の解析対象となった 5 人を含む）をこの研究から除外し、残りの 14 人の患者について後方視的に分析した (Table 11)。尚、治療については 60 歳以上の患者の場合は、研究 1 の「材料と方法」(11 ページ)でも記述した the modified version of the EORTC protocol が施行された (Table 2)<sup>9</sup>。59 歳以下の場合は、Memorial Sloan Kettering Cancer Center にて報告された R-MPV 療法をベースにして用いられた若年者用プロトコールである the modified R-MPV regimen followed by radiotherapy and high dose cytarabine が施行された<sup>7</sup>。

ID	Age	Sex	Concentration of cell-free DNA (ng/mL)	LDH (U/L)	sIL2R (U/mL)	Number of tumors	Size of tumors(mm) <sup>*1</sup>	Treatment regimen
TP73	55	M	153	192	152	>3	32	R-MPV
TP87	69	M	107	449	197	1	55	EORTC
TP89	59	M	2410	204	289	1	22	R-MPV
TP90	69	M	565	214	748	>3	46	EORTC
TP92	67	M	990	287	185	>3	14	EORTC
TP94	66	M	1400	221		>3	20	EORTC
TP95	72	M	793	182	312	2	30	EORTC
TP96	74	F	205	240	619	1	30	EORTC
TP98	75	F	172	138		1	30	EORTC
TP99	52	M	199.5	190	218	2	33	R-MPV
TP100	63	M	237	353	381	1	83	EORTC
TP101	77	M	133	191	281	1	42	EORTC
TP102	79	M	406	207	268	2	23	EORTC
TP103	73	F	487	153	236	>3	10	EORTC

Table 11 PCNSL 患者の臨床情報

R-MPV, Chemotherapy regimen of the modified R-MPV regimen followed by radiotherapy and high dose cytarabine;

EORTC, Chemotherapy regimen of the modified version of the EORTC protocol.

\*1 Major axis of the biggest tumor.

### Cell-free DNA の抽出

患者から採取された後に、つくば i-laboratory LLP において分離され、保存されていた 700～3000  $\mu$  L の血清を取り寄せた。取り寄せた血清からの DNA 抽出は血液内科にて行った。具体的には QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen, Hilden, Germany)を用いて QIAGEN のプロトコールに則った手法により、cell-free DNA を抽出した。最終的に DNA を 30～50 $\mu$ L AVE buffer (Qiagen, Hilden, Germany) に溶解し、使用するまで-25℃冷凍庫の中で保存した。

## ddPCR

定性的 PCR や、検量線による相対定量を行うリアルタイム PCR に対して、  
droplet digital PCR (ddPCR)は、サンプルに含まれる個々の分子の数をカウントすることで絶対定量を行うことのできる第 3 世代の PCR と言われている。

ddPCR は、サンプルを微小区画に分割した上で各微小区画の PCR 産物を検出し、統計解析を行って DNA を定量する方法である。微小区画作成の際には、1 ウェル当り 20,000 個の均一な液滴（ドロップレット）を作成する。PCR を行うことでターゲットとなる DNA が含まれるドロップレット内では増幅が起これば蛍光が増し、ターゲットが含まれないドロップレットでは蛍光が起これないため、蛍光の有無でポジティブかネガティブ、つまり「1」か「0」かの判定ができるようになる。QX-200 droplet reader (Bio-Rad) で1つずつドロップレットの蛍光を測定し、付随する QuantaSoft 分析ソフトウェア (Bio-Rad) によって解析することで、サンプル中に含まれるターゲット DNA のコピー数を定量できるという原理である。

本研究においては、Bio-Rad (Hercules、CA、USA)より ddPCR 用の試薬および *MYD88* L265P 変異に対応した遺伝子変異検出用キットを購入した。このキットにはプライマー1 セットと対立遺伝子に対する 2 種類のプローブが含まれており、1 つは野生型 (HEX) を検出し、1 つは変異型 (FAM) を検出する。

こちらのアッセイキットで混合サンプルに対する試験を行った場合、解析結果は Figure 7 の右端に示すように 2D プロットを用いて示され、黒色のクラスターはネガティブなドロップレット、緑色のクラスターは野生型 DNA のみポジティブなドロップレットを示す。また、青色のクラスターは変異型のみポジティブなドロップレット、オレンジ色のクラスターは野生型/変異型共にポジティブなドロップレットを示す。野生型及び変異型テンプレートの濃度は、各々のクラスターのドロップレットの数に基づいて算出される (Figure 7)。

続いて、実験のワークフローについて示す。4 $\mu$ l の cell-free DNA を、2 $\times$ ddPCR Supermix for Probes (no dUTP) (Bio-Rad) 10 $\mu$ L と、65nt の Amplicon を用いて作られた 1 $\mu$ L の ddPCR 変異アッセイ、超純水 5 $\mu$ L と混ぜてできた合計 20 $\mu$ l の混合物を 8 チャンネルの disposable droplet generator cartridge (Bio-Rad) のサンプルウェルに入れた。

その後、70  $\mu$ L droplet generation oil (Bio-Rad) を各サンプルウェルに追加した。

DG8 カートリッジホルダーに disposable droplet generator cartridge を装着し、Droplet generator (Bio-Rad) 内部にセットし、ドロップレットを作成した。ドロップレット生成終了後、各ウェル内のドロップレットを 96 ウェル PCR プレートに注意深く移した。プレートを PX1 PCR Plate Sealer (Bio-Rad) で

ヒートシールし、サーマルサイクリングに進んだ。増幅条件は、94℃/30 秒間の熱変性、56℃/1 分間のアニーリング&伸長反応を 40 回繰り返した。PCR の後、96 ウェル PCR プレートに QX-200 droplet reader (Bio-Rad) にセットした。得られた ddPCR データは、QuantaSoft 分析ソフトウェアによって解析した (Figure 7)。

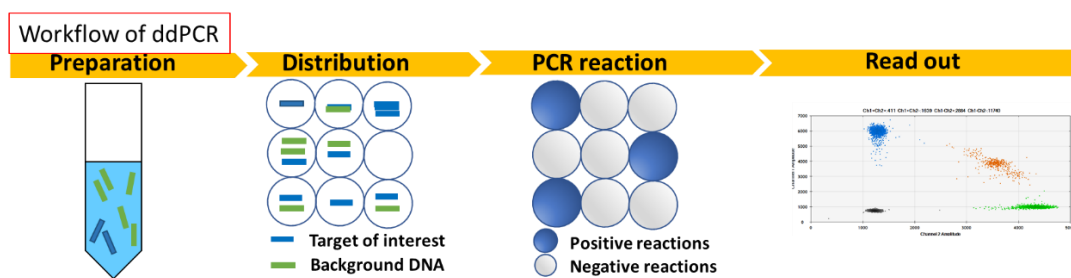


Figure 7 ddPCR のワークフロー



## アンプリコンシーケンス

アンプリコンシーケンスはターゲットリシーケンスの一種であり、特定のゲノム領域にみられる遺伝的変異を解析する高度なターゲット手法である。PCR 産物（アンプリコン）に対する超ディープシーケンスにより、効率的な変異検出および特性解明ができるとされている。

まず、*MYD88* のコドン 265 をコードするゲノム領域を増幅するようにプライマーを設計した (Table 12)。設計の際は Primer Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)を用いた。腫瘍及び血清、血漿から抽出した DNA に対して、耐熱 DNA ポリメラーゼ (TOYOBO Life Science, Osaka, Japan) を DNA polymerase として用いて PCR を行った。

PCR プロトコールは以下の通りであった: 94°C で 1 分、続いて 98°C で 10 秒、68°C で 30 秒の 2 ステップサイクルを 39 サイクル、終了後に 4°C で保存した。この PCR 産物を使用して、Ion Plus Fragment Library Kit (Thermo Fisher Scientific) のプロトコールに則ってライブラリー作製を行った上で、Ion One Touch 2 System を使用してテンプレート調製を行い、Ion PGM によりアンプリコンシーケンスを施行した。本体機器附属の Torrent Suites ソフトウェアを用いて変異解析を行った。

ID		Gene	Forward	Reverse
TP73	Tumor	MYD88 L265P	GGGATGGCTGTTGTTAACCT	GGTGTAGTCGCAGACAGTGAT
TP87	Tumor			
TP89	Tumor			
TP90	Tumor			
TP92	Tumor			
TP94	Tumor			
TP95	Tumor			
TP96	Tumor			
TP73	Cell-free DNA			
TP87	Cell-free DNA			
TP89	Cell-free DNA		CATGGCACCCCTTGGCTTG	TGCTGGGGAACCTCTTCTTCAT
TP90	Cell-free DNA			
TP92	Cell-free DNA			
TP94	Cell-free DNA			
TP95	Cell-free DNA			
TP96	Cell-free DNA			
TP103	Cell-free DNA		CATGGCACCCCTTGGCTTG	CAGGATGCTGGGGAACCTCTT

Table 12 アンプリコンシーケンスの際に使用したプライマーの一覧

## 統計解析

全てのデータの統計学的解析は EZR で行った<sup>32</sup>。

2 群の比較は t 検定により行った。

Cell-free DNA 中の遺伝子変異の有無が PFS または OS に及ぼす影響を調べるための単変量解析は、Wilcoxon 検定によって行った。全ての計算において両側検定を施行し、 $p < 0.05$  を有意であると見なした。

### 3.3 結果

#### ddPCR assay による *MYD88*L265P ポジティブコントロールとネガティブコントロールの設定

ddPCR を使用した解析を開始するにあたり、まずはポジティブコントロールとネガティブコントロールの設定を行った。*MYD88* L265P 変異アリル頻度 24.2%の凍結標本由来の DNA (ターゲットリシーケンスで解析。シーケンス深度 1920 x)をポジティブコントロールとして使用し、同量の野生型の DNA をネガティブコントロールとして利用した (Figure 8)。

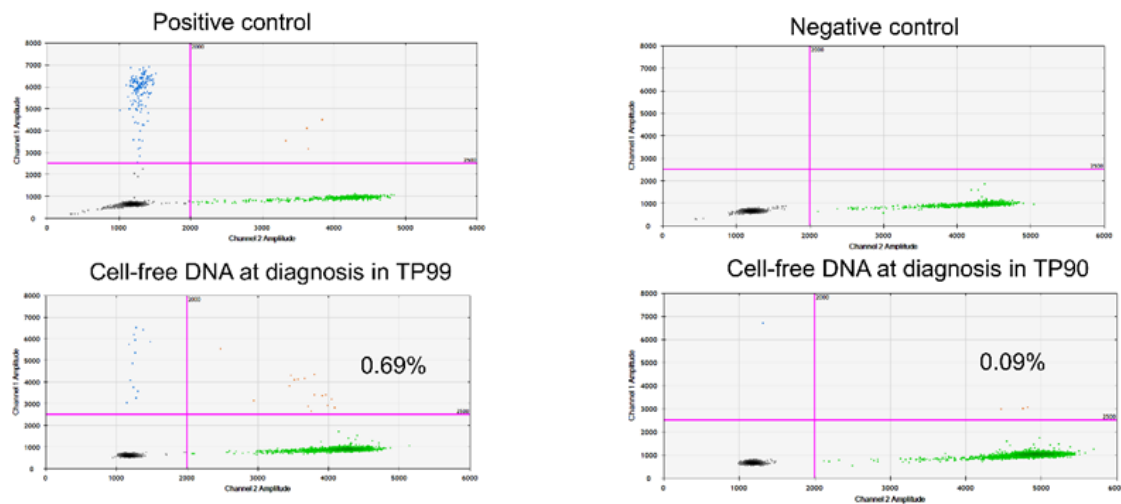


Figure 8 ddPCR の 2D プロットの例

QuantaSoft ソフトウェアの 2D プロットを用いて解析した。黒色のクラスターは DNA が全く含まれていないネガティブなドロップレット、緑色のクラスターは野生型 DNA のみポジティブなドロップレットを示す。また、青色のクラスターは変異型のみポジティブなドロップレット、オレンジ色のクラスターは野生型/変異型 共にポジティブなドロップレットを示す。左上がポジティブコントロールで右上がネガティブコントロールを示す。参考までに、TP90 と TP99 患者の cell-free DNA の解析結果も一緒に提示した。

## ddPCR assay とアンプリコンシーケンスによる *MYD88*L265P 検出限界と定量

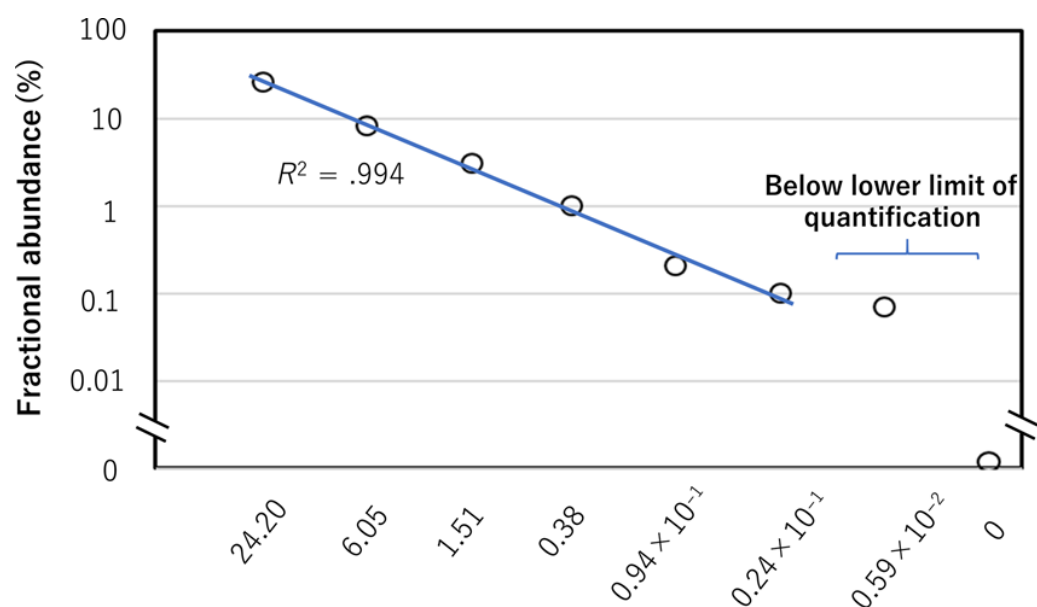
### 下限の検証

ddPCR と NGS による *MYD88* L265P 変異の検出感度限界 (limit of detection, LOD) と定量下限 (limit of quantification, LOQ) についての検証を行った。

ポジティブコントロールとして使用した、*MYD88* L265P 変異アリル頻度 24.2% の凍結標本由来の DNA を、DNA コピー数を調節した野生型の DNA と、様々な割合で混ぜることで、7 つの異なる濃度の段階希釈液を作成した。具体的には、最初に変異陽性 DNA と、同コピー数の野生型 DNA を 1 : 3 の割合で混ぜて、変異アリル頻度 1/4 (6.05%) の希釈液を作り、それに対してさらに同コピー数の野生型 DNA を 1 : 3 の割合で混ぜて、変異アリル頻度  $(1/4)^2$  (1.5125%) を作り、同様の希釈を繰り返して、変異アリル頻度  $(1/4)^3$  (0.378125%),  $(1/4)^4$  (0.09453125%),  $(1/4)^5$  (0.0236328125%), の希釈液を作成した。ddPCR を使ってポジティブコントロール及び全ての希釈液を解析した結果、ポジティブコントロールは 23% であり、希釈液の変異アリル頻度はそれぞれ、1/4 → 8.3%,  $(1/4)^2$  → 3.1%,  $(1/4)^3$  → 1.0%,  $(1/4)^4$  → 0.2%,  $(1/4)^5$  → 0.1% と算出され、データは 0.024% の希釈度まで正確性および直線性を示した (Figure 9)。この希釈濃度のサンプルは ddPCR による解析では 0.1% に相当していた ( $R^2$  は 0.994 であった)。 $(1/4)^6$

(0.005908203125%) に希釈した陽性対照を ddPCR により陽性と判定したが、分画存在量は 0.07% であり、この希釈レベルでは定量化が不正確であることが示唆された (Figure 9)。(1/4)<sup>6</sup> 未満の全ての希釈率は 0% を示した (Figure 9)。

この結果に基づいて、ddPCR の LOQ は 0.024% と定義され、ddPCR の解析では 0.1% 相当であった。LOD は 0.0059% であり、ddPCR では 0.07% 相当であった (Figure 9)。



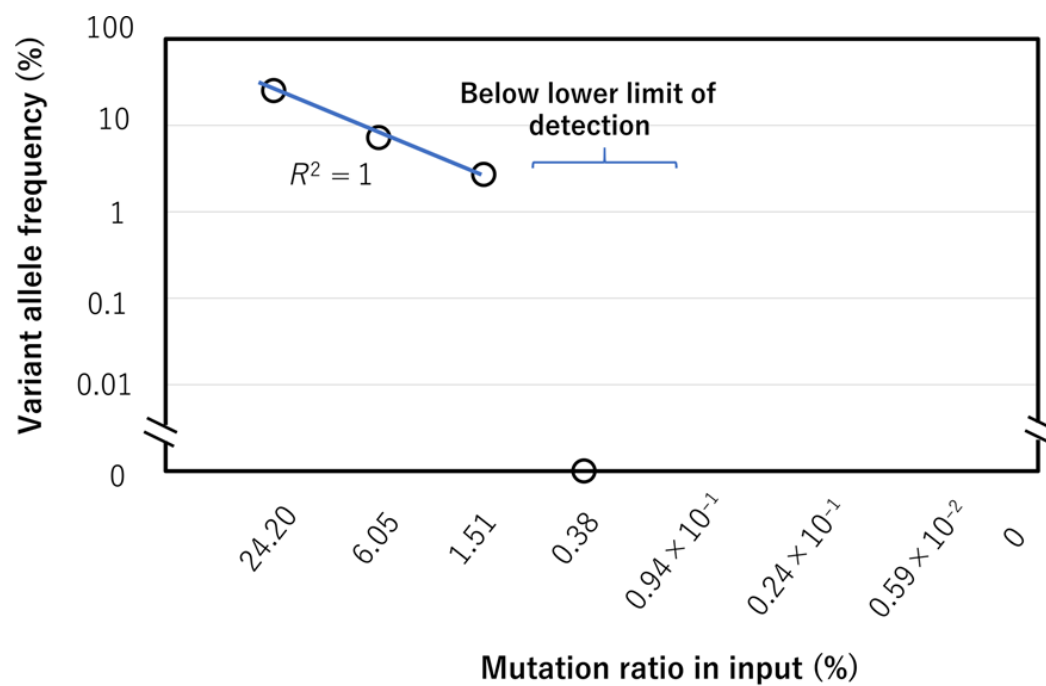
**Figure 9 ddPCR の感度**

横軸は ddPCR の解析の際にインプットした各希釈液中の DNA の *MYD88* L265P 変異アリル頻度 (%) を指す。縦軸の Fractional abundance (%) は、ddPCR での解析の結果として算出された同変異アリル頻度を示している。

検出感度限界 (limit of detection, LOD) は 0.006% (ddPCR の解析では 0.07% 相当) であり、検量感度の限界 (limit of quantification, LOQ) 0.025% (ddPCR の解析では 0.1% 相当) であった。

同様の希釈シリーズに対し、アンプリコンシーケンスで解析を行った。シーケンス深度は 20,000 x 前後であり、解析の結果得られた変異率をプロットした (Figure 10)。1/4 (計算で 6.05%に相当)、 $(1/4)^2$  (1.5125%)、および $(1/4)^3$  (0.378125%) の希釈では、アンプリコンシーケンスによる解析の結果に基づき算出された変異アレル頻度は、それぞれ 7.2%、2.7%、および 0%であった。 $(1/4)^3$  未満の全ての希釈率は 0%を示した。これに基づいて、LOD と LOQ のカットオフ値を 1.51%と決定した。log-log スケールに変換した後、データは、1.51%の希釈度までの精度と直線性を示した ( $R^2=1$  ; Figure 10))。

結果的にアンプリコンシーケンスの LOQ および LOD は 1.51%と定義され、アンプリコンシーケンスによる解析で算出した変異アレル頻度では 2.7%であった (Figure 10)。



**Figure 10** アンプリコンシーケンスの感度

横軸は ddPCR の解析の際にインプットした各希釈液中の DNA の *MYD88* L265P 変異アリル頻度 (%)を指す。縦軸の Variant allele frequency (%)は、アンプリコンシーケンスでの解析の結果として算出された同変異アリル頻度を示している。

検出感度限界 (limit of detection, LOD) は 1.5%であり、検量感度の限界 (limit of quantification) 2.7%であった



#### 原発腫瘍由来 DNA 中の *MYD88* L265P

14 人の PCNSL の患者から採取した腫瘍検体（FFPE で保存）から DNA を抽出し、それらに対して ddPCR 及びアンプリコンシーケンスを施行し *MYD88* L265P の有無を確認した。本コホートにおいては、*MYD88* L265P 変異は 14 人全ての患者の腫瘍サンプルから検出され、アンプリコンシーケンスでは変異アリアル頻度は 10.5% - 87.0% で、シーケンス深度は 16868 x – 19993 x。ddPCR においても、同様であり各々のサンプルの変異アリアル頻度はアンプリコンシーケンス, ddPCR とで大きく変わらなかった (Table 13)。

Mutation ratio of MYD88 L265P (%)						
	Tumors			Cell-free DNAs in serum		
	NGS		ddPCR	NGS		ddPCR
	VAF (%)	Reads showing the mutation/total reads		VAF	Reads showing the mutation/total reads	
TP73	43.2	8584/19870	ND	0	0/19996	0
TP87	65.5	13070/19954	ND	0	0/19930	0.40
TP89	35.1	6979/19882	ND	0	0/19981	0.19
TP90	40.9	8137/19895	ND	0	0/19980	0.09
TP92	53.3	10534/19763	ND	0	0/19985	0.10
TP94	61.3	12233/19956	ND	0	0/19948	0.38
TP95	36.4	7230/19862	ND	0	0/19963	0.14
TP96	56.1	11122/19825	ND	0	0/19972	0.47
TP98	88.7	17736/19993	87	0	0/19987	0
TP99	56.6	11299/19974	55.9	0	0/19994	0.69
TP100	75.2	15025/19980	79	ND	ND	0
TP101	9.2	1844/19988	10.5	0	0/12560	0
TP102	43	7260/16868	38.3	0	0/19991	0
TP103	19.7	3928/19973	17.1	0	0/19989	0

ddPCR, droplet digital PCR; FA, fractional abundance; ND, not done; NGS, next-generation sequencing; PCNSL, primary central nervous system lymphoma; VAF, variant allele frequency.

**Table 13 PCNSL 患者における *MYD88* L265P 変異の確認**

14 人の PCNSL 患者の腫瘍組織由来 DNA 及び cell-free DNA に対し、ddPCR と NGS を使用して *MYD88* L265P を標的とした解析を行った。

ddPCR; デジタル PCR (droplet digital PCR), FA; fractional abundance, ND; 未施行(not done), NGS; next-generation sequencing, Reads showing the mutation; 変異陽性リード数、total reads; 総リード数 (シーケンス深度), VAF; 変異アリル頻度 (variant allele frequency)

### 診断時血清中の cell-free DNA の濃度について

1ml の血清から得られた cell-free DNA の濃度は 107 ng ~ 2410 ng であった (Figure 11)。

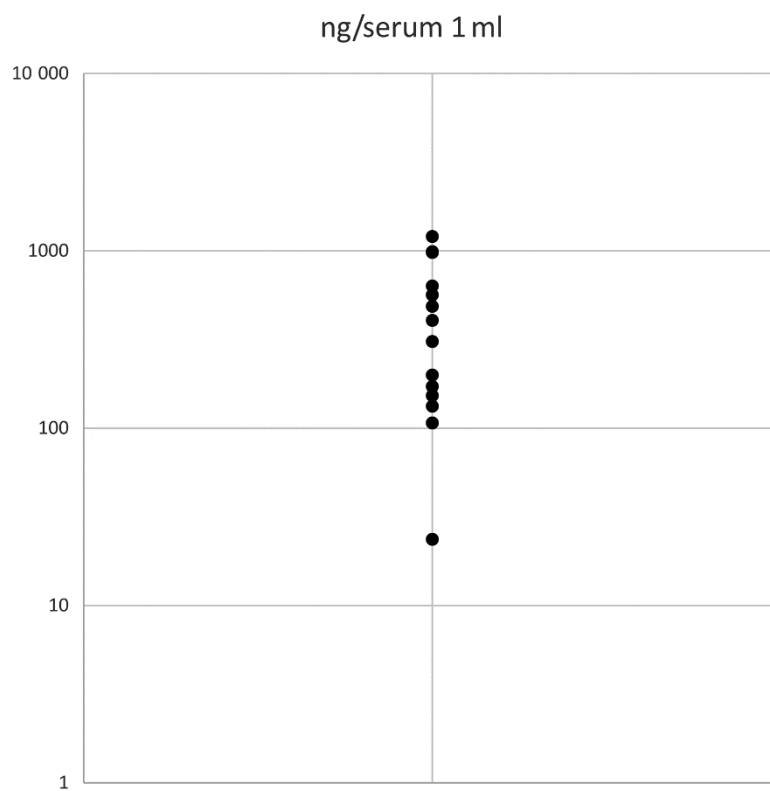


Figure 11 血清から得られた cell-free DNA

*MYD88*L265P mutation は ddPCR で解析を行うことで、14 人中 8 人の診断時血清中の cell-free DNA から検出された。他の 6 人の変異が陰性であった患者の内、診断時の血漿が使用可能だったのは TP103 の一人だけであった。同患者の血漿についても同様に ddPCR で解析を行ったところ、血清の場合と同様変異は検出されなかった (Table 14)。

Cell-free DNA 中の *MYD88*L265P mutation の変異アリル頻度は、腫瘍由来 DNA のそれと比較すると、有意に低かった (cell-free DNA, 0.34% [range, 0.1%-0.69%] vs 腫瘍由来 DNA, 48.5% [10.5%-87%],  $P < .001$ , Table 13)。TP100 を除いた 13 人については、cell-free DNA が充分量残存していたため、それらに対してアンプリコンシーケンスを施行し *MYD88* L265P 変異の有無を確認したところ、どのサンプルにおいても変異は検出されなかった (シーケンス深度; 12560 – 19996 x)。ddPCR での変異検出の有無に関係なく、アンプリコンシーケンスでは *MYD88* L265P 変異を cell-free DNA から検出することはできなかった。また、cell-free DNA 中の変異の有無は、LDH ( $P = 0.360$ )、sIL2R ( $P = 0.354$ )、cell-free DNA の濃度 ( $P = 0.105$ )、腫瘍の大きさ ( $P = 0.611$ )、及び予後 (OS,  $P = 0.386$ ; PFS,  $P = 0.629$ )などの臨床因子との関連は認められなかった。

	Mutation ratio of <i>MYD88</i> L265P					
	Cell-free DNAs in plasma			Cell-free DNAs in serum		
	concentration	Reads showing the mutation/total reads	<i>MYD88</i> L265P	concentration	Reads showing the mutation/total reads	<i>MYD88</i> L265P
TP 103	291 ng/ml	0/13387	negative	365 ng/ml	0/14495	negative

Table 14 TP103 の患者の血清及び血漿から抽出した cell-free DNA の濃度と *MYD88* L265P 変異の頻度の比較

### 臨床経過における cell-free DNA 中の *MYD88* L265P の変異アリル頻度の推移

Cell-free DNA 中の *MYD88* L265P 変異が、疾患経過（寛解など）を予測する上での有用な指標になりうるか否かを評価するため、診断時の cell-free DNA で *MYD88* L265P が陽性であった患者 5 人に対して、化学療法施行中及び施行後に採取された cell-free DNA 中に *MYD88* L265P 変異が検出されるか否かを ddPCR により解析した。

高齢者用のプロトコールである the modified EORTC regimen<sup>9</sup> で治療された TP92 と、60 歳未満の若年者用プロトコールである R-MPV regimen<sup>52</sup> で治療された TP99 の患者はともに観察期間中に CR を達成している。この 2 患者においては、治療中のどの時点においても、cell-free DNA からの変異の検出は認めなかった (Figure 12)。

一方で、TP87 と TP89 は、治療によって一旦寛解に達した後 3~12 カ月の間に再発を来しており、TP89 においては、眼内再発のみ（中枢神経には再発なし）であったが、TP87 では、増悪時の腫瘍のサイズが診断時よりも大きくなっていた（診断時: 10 × 15 mm vs 増悪時: 42 × 55 mm）。また、TP90 においては、the modified EORTC regimen で治療されるも、途中で治療抵抗性に増悪し、治療中断となった経緯があり、この患者においても増悪時の腫瘍のサイズは診断時のそれよりも大きかった（診断時: 37 × 46 mm vs 増悪時: 56 × 70 mm）。これらの

患者においては、再発時の病勢増悪にもかかわらず、再発時に採取された cell-free DNA からは *MYD88* L265P 変異は検出されなかった (Figure 12)。

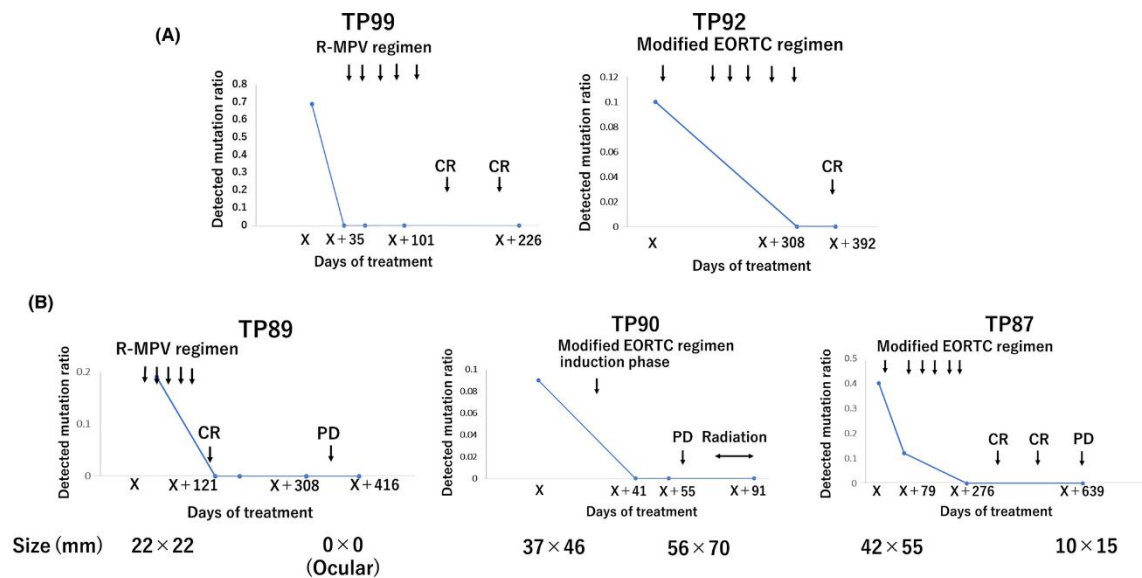


Figure 12 臨床経過における cell-free DNA 中の *MYD88* L265P の変異アリル頻度の推移

- A、経過中 CR を維持していた患者。  
B、治療中または治療後に再発ないし増悪した患者。

### 3.4 考察

本研究は、PCNSL 患者の内 57.1%において、ddPCR を利用することで治療前血清中の cell-free DNA から *MYD88* L265P 変異が検出されたことを示した。

PCNSL の cell-free DNA におけるこの変異の実際の検出率を確定させるためには、さらなる分析が必要と考えられる。liquid biopsy に関する以前の報告と同様に、ddPCR アッセイが cell-free DNA 中の変異を検出する上で信頼できる方法であり、非常に少数の変異コピーを検出する際にアンプリコンシーケンスよりも有用性が高いことが、本研究結果から示唆された。

Nakamura らは、殆どの PCNSL が *MYD88* および *CD79B* を有していたのに対し、グリア芽腫 (GBM) ではこれらの変異が全く検出されなかったことを報告した<sup>51, 53</sup>。このことから、*MYD88* や *CD79B* の遺伝子変異は、悪性脳腫瘍の鑑別診断を行う上での一助となると考えられた<sup>51</sup>。

私の分析では、PCNSL 中の cell-free DNA の濃度は 107~2410ng / mL であり、健康なボランティアから調製した cell-free DNA の濃度のレベル (1~10ng / mL) よりも有意に高かった<sup>54</sup>。更には、結腸直腸癌、肺癌および乳癌 (範囲 0.5~1980ng / mL) などの非血液腫瘍患者における cell-free DNA の濃度よりも高いようである<sup>55-57</sup>。しかしながら、全身性リンパ腫 (範囲 100~14180ng / mL) の患者における cell-free DNA の濃度範囲よりは低かった<sup>58-59</sup>。



本研究では、cell-free DNA 中の *MYD88* L265P 変異は、アンプリコンシーケンスによる解析では検出されなかった。しかし、Fontanilles らは、最近、アンプリコンシーケンスによって PCNSL 患者の cell-free DNA において *MYD88* L265P 変異を含む CNS 腫瘍に特異的な種々の体細胞変異が検出されたことを報告した<sup>60</sup>。彼らの研究では、cell-free DNA における *MYD88* L265P 変異の variant allele frequency (VAF)は、私の研究よりも桁違いに高かった(平均 4.7% 対 0.34%)<sup>60</sup>。

Fontanilles らがアンプリコンシーケンスによる変異の検出に成功した主な理由は、cell-free DNA 中の VAF が高いことであると考えられた。彼らの研究では、cell-free DNA の抽出に使用した材料は血漿であったが、私の場合は血清であり、この相違が私の研究と Fontanilles らの報告との VAF の違いを説明する可能性があると思われた。一方、私の研究で TP103 の患者の血清と血漿の両方において cell-free DNA 中の VAF は 0%であり、差は認められなかったが (Table 14)、治療前の血清と血漿の両方が入手可能であったのはこの TP103 の患者のみであり、本研究では血清と血漿との間で cell-free DNA の VAF の相違が生じるか否かは十分には証明できなかった。不一致の別の潜在的原因としては、コホート間の偏りである可能性がある。PCNSL の確定診断は開頭生検のみであるため、診断に至る時期がコホート間で異なる可能性もある。以前の研究に

において、いくつかのタイプのリンパ腫における cell-free DNA が、腫瘍の進行度合いに比例して変動するマーカーでもあり得ることが示されており<sup>61-63</sup>、今回の PCNSL の場合においてもコホート間での診断時期の違いが、cell-free DNA を採取する際の原発病変の大きさや進行度の違いにつながり、結果的にコホート間での治療前 cell-free DNA 中の VAF の違いを生んだ可能性は考えられる。

過去の報告において、DLBCL では CAP-seq による癌個人化プロファイリングおよび cell-free DNA を用いたクローン型 Ig 再構成を同定するハイスループットシーケンスも、cell-free DNA を用いた最小残存疾患 (MRD) 再発の早期発見に有用であることが示された<sup>57, 61-62</sup>。

最近、坂田らによって、cell-free DNA 中の血管免疫芽球性 T 細胞リンパ腫に特異的な遺伝子変異が、MRD の非侵襲的モニタリングに適用可能であることが示された<sup>63</sup>。しかし、本研究では、*MYD88* L265P 変異は、治療前の cell-free DNA からは検出されたものの、治療後においては、たとえ原病が増悪した状態であっても cell-free DNA からは検出されなかった。この結果から、cell-free DNA に対する変異解析は、全身性リンパ腫患者の微小残存病変 (minimal residual disease; MRD) のモニタリングに有用であることは過去の報告で示されたものの<sup>62 63</sup>、PCNSL 患者の疾患経過のモニタリングには適用できない可能性があることが示唆された。なぜ *MYD88* L265P 変異が Progressive disease の

状態で検出不能であったのかは明らかではない。TP90 においては疾患進行時の PCNSL の腫瘍サイズが診断時よりも大きかったことを考慮すると、腫瘍サイズは理由を説明できないことがある。同変異が検出不能であった原因としては他に、再発腫瘍において *MYD88*L265P 変異陰性クローンが拡大していた可能性、または cell-free DNA が化学療法後に末梢血中を循環していなかった可能性などが挙げられる。残念ながら、臨床経過の中で cell-DNA の *MYD88* L265P 変異の推移を追うことができたのは 5 例のみであった。今後、症例数を増やした上でさらなる解析を行うことにより、*MYD88* 変異が MRD の検出に適用可能かどうかを判定することが可能になると考えられる。

本研究は、PCNSL 患者の 57.1%において、ddPCR アッセイによって診断時の血清中 cell-free DNA から *MYD88* L265P 変異が検出されたことを示した。cell-free DNA には予後予測のためのモニタリングや診断ツールとしての有用性に期待が寄せられているが、実際の問題点としては DNA 量は微量であり、また不安定なのでそれらの要因が感度に影響している可能性がある<sup>27</sup>。過去の報告では、進行がんにおける腫瘍由来の cell-free DNA の特異度は 96%とされている一方で、感度については 70–90%程度と報告によって感度の変動があり、進行期の腫瘍体積が大きい場合でも、DNA の量や質により、検出できないこともあることが示唆される<sup>64</sup>。また、脳腫瘍由来の cell-free DNA の場合、他の癌

(肺がんや消化器癌など)と比較すると血中の **cell-free DNA** の濃度が下がるとする報告があり、**blood brain barrier** による通過障害も影響していると考えられた<sup>64</sup>。このことから、本研究において症例によっては *MYD88* 変異が検出されない場合もあったのは、**cell-free DNA** 自体の不安定性や **blood brain barrier** による障害が原因となっている可能性が考えられた。

PCNSL の **cell-free DNA** におけるこの変異の実際の検出率を決定するためには、さらなる解析が必要と考えらえる。liquid biopsy に関する以前の報告と同様に、本研究の結果は ddPCR アッセイが **cell-free DNA** 中の遺伝子変異を検出する上で信頼できる手法であり、アンプリコンシーケンスよりも有用性が高いことを確認した。原発腫瘍での *MYD88* L265P 変異陽性患者の **cell-free DNA** における同変異の検出率は 57%であり、ddPCR を使用した **cell-free DNA** 中の *MYD88* L265P 変異の確認は、PCNSL の非侵襲的診断のための有用な方法として役立ち得る。

## 4. PCNSL における原発腫瘍および中枢神経外再発腫瘍の遺伝子変異プロファイルの比較を通じた、共通前駆細胞の存在の確認

### 4.1 背景

PCNSL においては、その一般名称が「中枢神経原発」とされているが、その起源が中枢神経に存在するか否かについては不明であり、議論的となっている。先述のように、大量 MTX や放射線照射をベースとした治療法が様々な形でアップデートされてきたが、未だ平均予後は 4 年以下であり、新たな治療戦略が必要である<sup>3</sup>。治療法を開発するにあたり、PCNSL という特殊なリンパ腫亜型の病態や起源を解明することが重要な課題である。

研究 1 では、PCNSL の特殊な変異、つまり PCNSL の腫瘍発生に関係する可能性のある遺伝子異常について述べた。*MYD88* 遺伝子のホットスポット変異である *MYD88* L265P は、多くの PCNSL 患者（38～85.4%において認められており、PCNSL において確認された遺伝子異常の中でも特に高頻度に検出される<sup>22-26</sup>。同変異は NF $\kappa$ B signaling pathway の活性化を経て、Bruton's tyrosine kinase 遺伝子の発現上昇をもたらすことが知られており、これを抑制する働きのある iburutinib が、再発難治 PCNSL に対して奏功したという研究成果が報告されたことは研究 1 の討論の部分で述べている<sup>40-41</sup>。

PCNSL の発生機序について考えるにあたって、中枢神経に局限して発症するという特殊な phenotype についても注目する必要がある。PCNSL の原発部位については、中枢神経外に subclinical な腫瘍前駆細胞が存在する可能性を示したのが Fukumura らの論文である。同論文によると、PCNSL 腫瘍において検出された *MYD88* L265P 変異が、末梢血単核細胞（Peripheral blood mononuclear cells: BMMNC）においても認められ、これは同変異が PCNSL 発症の初期の遺伝学的イベントとして中枢神経の外側で起きている可能性がある」と報告されている<sup>26</sup>。これは、リンパ腫細胞が頭蓋の外側で発生したことを示唆している。しかしながら、PCNSL の実際の発達プロセスは、異なる観点から検討されるべきである。

他のタイプのリンパ腫、例えば濾胞性リンパ腫（follicular lymphoma: FL）およびマンツル細胞リンパ腫（mantle cell lymphoma: MCL）において、診断時の腫瘍におけるゲノム異常と再発時のそれとの比較を通して、初発時と再発時に共通した遺伝子異常が認められたのと、初発時に認めていた遺伝子変異の一部が再発時には消失しているという結果が得られた<sup>65-66</sup>。この結果より、原発性腫瘍および再発性腫瘍に対する共通前駆細胞（common precursor cell: CPC）の存在が示唆された。つまり、FL および MCL は、原発腫瘍または再発腫瘍のいずれかに特異的な変異を獲得することによって、CPC から各々独立して発生

する可能性があると考えられた<sup>65-66</sup>。PCNSLは、再発の大部分の症例において CNS 内で繰り返されるが、再発した症例の 7%未満の割合で、中枢神経外の再発が起きるとされている<sup>67</sup>。本研究は、中枢神経内の原発性腫瘍および中枢神経外再発の病変を検査することによって、PCNSLにおける CPC の存在が示唆されるか否かを確認した。また、CPC の存在を同定することを目的とし、骨髄単核細胞（Bone marrow mononuclear cell: BMMNC）における *MYD88* 変異の有無を確認した。

## 4.2 材料と方法

### 臨床検体

2005 年 3 月から 2015 年 5 月にかけて、筑波大学附属病院で PCNSL と診断された患者 80 名の内、中枢神経外の再発を経験した患者 6 名を対象とした。1 症例においては、他院にて再発を診断されたため、再発時のサンプルが入手できなかったことから、こちらの患者を研究コホートから除外した。残りの 5 人の患者を解析対象とした。尚、この 5 人は全員研究 1 の解析対象となった 42 症例に含まれている。この 5 人をこの研究のコホート 1 と定義し、5 人全員の原発の PCNSL の病変、中枢神経外再発の病変及び BMMNC に対してシーケンス解析を施行した。

さらに、腫瘍が *MYD88* L265P 変異を有し、診断時に BMMNC が利用可能であった PCNSL を有する 23 人の患者が、この研究に組み込まれた。この 23 症例はコホート 2 と定義した。尚、コホート 2 の中にはコホート 1 の中枢神経外再発を経験した症例の内 3 症例が含まれている。コホート 1 とコホート 2 の関係について、ベン図を使用して Figure 13 に記載した。

本研究は、筑波大学病院倫理委員会の承認を受けている。

また、研究 1 と同様に GCB および non-GCB 表現型は、Hans 2 の基準に従って免疫組織化学的染色によって決定した<sup>14</sup>。



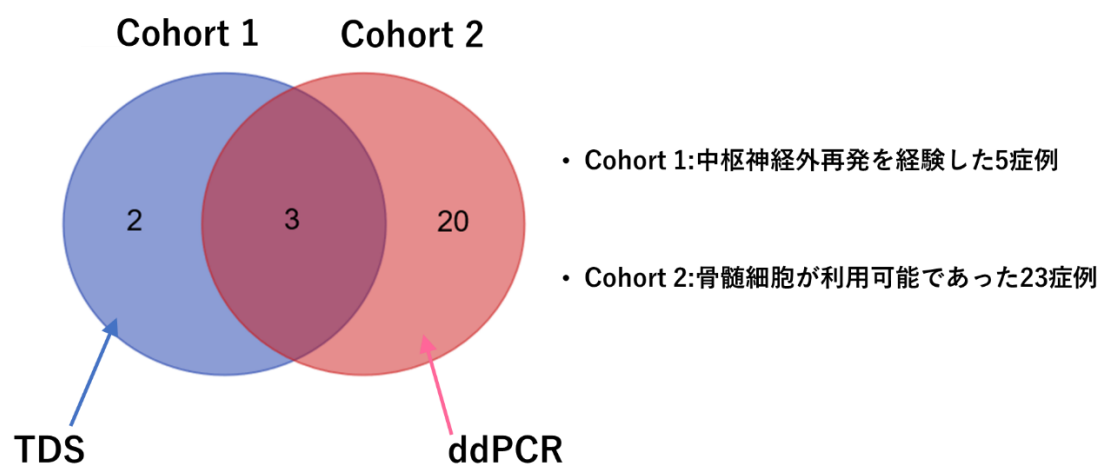


Figure 13 研究3において解析対象となったコホートについて

TDS : ターゲットリシーケンス、ddPCR : droplet digital PCR

### 単核細胞の分離

血液および骨髄は治療前に採取したものを用いた。まずは単核球を分離するために、PBS で 3 倍に希釈した全血および骨髄を、チューブ内の同量の Ficoll-Papue に静かに層状にし、450xg で 30 分間遠心分離した。第 2 層を新しい管に静かに移し、10ml の PBS を添加した。450xg で 10 分間遠心分離した後、ペレット化した細胞を計数し、トリパンブルー染色を用いて生存率を計算した。細胞を直ちに使用するか、使用するまで-80℃で保存した。

### 凍結サンプルおよび FFPE からの DNA 抽出

中枢神経外再発の病変の標本については、凍結組織サンプル（患者 T1）および FFPE サンプル（患者 T2、T5、TP39、および TP44）が得られた。凍結サンプルから DNA を抽出する際は QIAmp DNA Mini Kit（Qiagen）を使用し、また FFPE から DNA を抽出する際は QIAmp DNA FFPE 組織キット（Qiagen）を使用した。また、BMMNC や PBMNC から DNA 抽出する際は QIAmp DNA Mini Kit（Qiagen）を用いた。Qubit Fluorometer（Thermo Fisher Scientific）を用いて、抽出された DNA の濃度を測定した。

### Realtime-PCR による DNA の Quality check

腫瘍から抽出した DNA の Quality check (QC) を、Agilent NGS FFPE QC キット (Agilent, Wilmington, USA) を用いた realtime-PCR システムで実施した (<https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/G9700-90000.pdf#search=%27Agilent+NGS+FFPE+QC%27>)

まず、2×Brilliant SYBR Green QPCR Master Mix 10  $\mu$ l、プライマーセット A (または B) 1  $\mu$ l、control 色素 0.3  $\mu$ l を DNA 4  $\mu$ l (500pg) と混ぜて、計 20  $\mu$ l と

した。次いで、サーマルサイクラーを用いて PCR 増幅を行った。プロトコールは、初期の annealing のステップを 95°C で 3 分間、続いて denaturation を 95°C で 10 秒間および annealing/extension のステップを 63°C で 20 秒間の計 30 秒の工程を 40 サイクルを行うスケジュールで構成されたものを使用した。

抽出 DNA の品質( $\Delta Cq$ )は、2 種類のプライマーセット(A と B)を用いて qPCR 結果を比較することによって決定した。実際には各サンプル及びreference DNA の  $\Delta Cq$  を算出し、 $\Delta Cq$  sample から  $\Delta Cq$  reference を差し引いて算出した  $\Delta \Delta Cq$  sample を基に比較定量を行った。

## ターゲットリシーケンス解析

PCNSLにおいて特に変異の頻度が高いとされている12の候補遺伝子を標的とした解析は研究1において既に施行されているが、本研究は腫瘍の変異プロファイルの解析を通して、PCNSLの起源について探ることを主眼に置いているため、より網羅的な遺伝子変異の検索が必要と考えた。PCNSLの変異プロファイルはNF $\kappa$ B signaling pathway 関連の遺伝子変異パターンへ偏る傾向にあるが、PCNSLの病理組織型はDLBCLであり、病態の把握のためにはNF $\kappa$ B以外にも、エピゲノム関連遺伝子などその他の様々な系統の遺伝子について検索する必要があると考えた。そのため、過去にMorinらが施行した、DLBCLに対する網羅的なターゲットリシーケンスの報告を参考にして、34遺伝子をターゲットとしたプライマープールを用いて、5ペアの原発および中枢神経外再発腫瘍、およびコントロールとして準備した骨髄単核球（Bone marrow mononuclear cells: BMMNCs）において実施した（Table 15）<sup>68</sup>。こちらの34遺伝子を標的としたプライマープールは、カスタムAmpliseq Designer システム（Thermo Fisher Scientific）によって設計された。ライブラリー作製のプロトコルや、テンプレート調製、その他の工程は研究1の「方法」の「ターゲットリシーケンス」と同じ方法を用いた。

また、ターゲットリシーケンスの結果得られた次に示したデータ解析パイプライン (Table 16) に則って、変異の絞り込みを行った。こちらも研究 1 の場合と同様に、まずは Web ベースのアプリケーションである wANNOAR (<http://wannovar.wglab.org/>) に、解析で得られたデータをインプットし変異データのアノテーションを行った。次に synonymous な変異は除外した。骨髓に変異がなくて腫瘍にだけ変異があることを確認した場合は体細胞変異としてリストに残した。Variant allele frequency の cut off については、本研究においては検証にアンプリコンシーケンスを用いたため、cut off を 3% とし、3% 以上の頻度を有する一塩基変異体または挿入/欠失を体細胞変異とみなした。

<i>TNFRSF14</i>		<i>BRAF</i>		<i>CIITA</i>	
<i>ID3</i>		<i>EZH2</i>		<i>SOCS1</i>	
<i>CD58</i>		<i>MFHAS1</i>		<i>TP53</i>	
<i>NOTCH2</i>		<i>MYC</i>		<i>CD79B</i>	
<i>ITPKB</i>		<i>CDKN2A</i>		<i>GNA13</i>	
<i>XP01</i>		<i>CDKN2B</i>		<i>BCL2</i>	
<i>MYD88</i>		<i>NOTCH1</i>		<i>TCF3</i>	
<i>IRF4</i>		<i>KMT2D</i>		<i>MEF2B</i>	
<i>PIM1</i>		<i>STAT6</i>		<i>CD79A</i>	
<i>PRDM1</i>		<i>FOXO1</i>		<i>EP300</i>	
<i>TNFAIP3</i>		<i>B2M</i>			
<i>CARD11</i>		<i>CREBBP</i>			

Table 15 ターゲットリシーケンスによって新たに解析された 34 遺伝子のリスト。

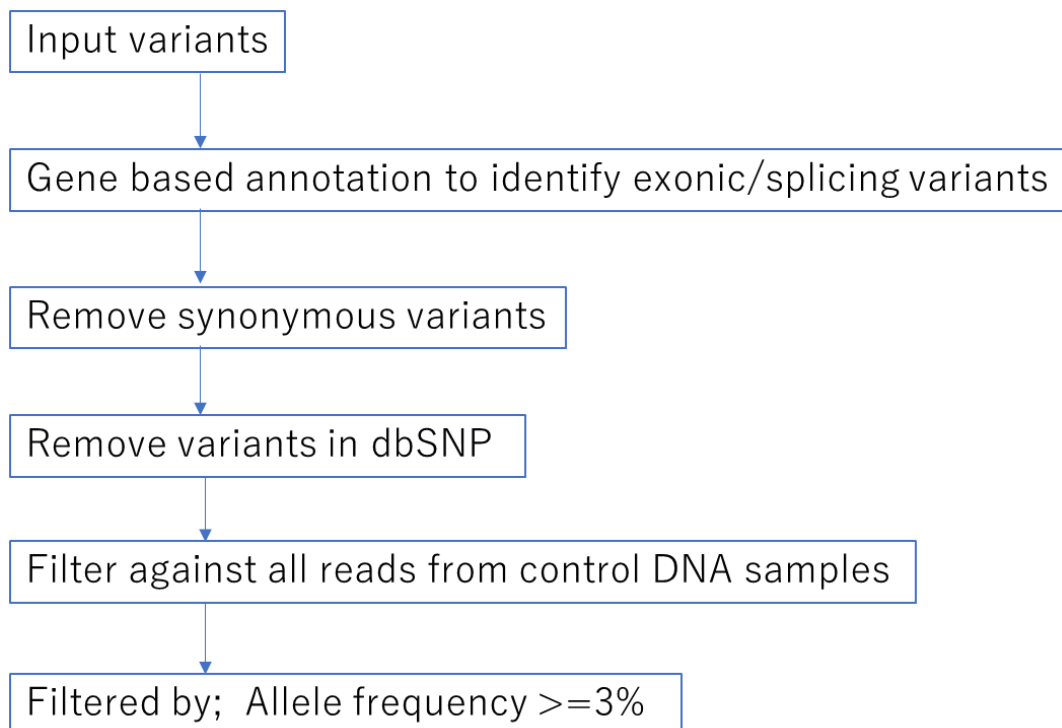


Table 16 変異データの解析パイプライン

### アンプリコンシーケンス

ターゲットリシーケンスで得られた解析結果を検証する目的で、アンプリコンシーケンスを行った。ターゲットリシーケンスで確認された遺伝子変異の領域をコードするゲノム領域を増幅するようにプライマーを設計した (Table 9)。設計方法や、PCR プロトコール、ライブラリー作製、テンプレート調製などの手順は研究 2 の「方法」の「アンプリコンシーケンス」と同様であるため、ここでは詳細は割愛する。

## ddPCR 分析

研究 2 の「方法」の「ddPCR」同様の手順で手技を施行した。

## PCR 法を使用した免疫グロブリン重鎖遺伝子再構成の検討

中枢神経外再発を経験した 5 症例の、初発と中枢神経外再発の病変から DNA を抽出し、免疫グロブリン重鎖遺伝子 (IgH) の再構成を解析した。プライマーは CDR3 領域より上流の FR2A または FR3A をフォワードプライマーとし、下流にある LJH に対するリバースプライマーと一緒に用いて最初の PCR を行った。次の工程では、その領域の内側の VLJH をリバースプライマーとして PCR を再度施行する semi-nested PCR 法を行った。以下に使用したプライマーの詳細を示す： FR2A 、 TGGRTCCGMCAGSCYYCNGG； FR3A 、 ACACGGCYSTGTATTACTGT； LJH 、 TGAGGAGACGGTGACC； VLJH 、 GTGACCAGGGTNCCTTGGCCCCAG。両方の工程において、反応液として TaKaRa Taq 試薬 (Takara, Shiga, Japan) を使用した。第 1 の PCR (35 サイクル) は 100ng の DNA をテンプレートとして使用し、第 2 の PCR (20 サイクル) は第 1 の PCR 産物 1  $\mu$ l をテンプレートとして反応させた。第 1 段階目の PCR のプロトコールは、denaturation を 94°C で 15 秒間、annealing を 55°C で 30 秒間、そして extension を 72°C で 30 秒間 (35 サイクル)。第 2 段階では、

denaturation を 94°C で 10 秒間、annealing を 55°C で 10 秒間、そして extension を 72°C で 10 秒間（20 サイクル）とした。これらの反応の前に、94°C で 5 分間の初期の変性工程を行い、72°C で 7 分間の最終伸長反応で終了させた。電気泳動によりエチジウムブロマイドで染色した 3% アガロースゲルで 10 $\mu$ l の PCR 産物を分析し、紫外光下で観察した。さらに、分解能を向上させるために、PCR 産物をアクリルアミドゲル上で電気泳動した。

PCR アンプリコンを、QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) を用いて抽出し、ダイレクトシーケンスにより配列決定した。得られた配列を国際 ImMunoGeneTics 情報システム (IMGT) (<http://www.imgt.org>) の IMGT/V-QUEST に入力して用いて VDJ の組み合わせを分析した。



#### 4.3 結果

##### 臨床経過および解析に用いたサンプルの質について

中枢神経外の再発を経験した 5 人の PCNSL 患者の臨床経過および組織学的所見を Figure 14, Table 17,18,19 に要約する。これらすべての患者において、PCNSL の高齢者用プロトコールによる治療の施行中または終了時に最初の完全寛解 (CR) が達成され、1 年以上維持された (Figure 14)。その後、中枢神経外の再発が起こった (Figure 14)。PCNSL の診断から中枢神経外再発までの中央値は 18 カ月であった (Figure 14, Table 17)。再発の部位は、T1 は上顎洞および顎下リンパ節、T2 は腹腔内リンパ節および背部の皮下組織、T5 は右大腿皮下組織及び左乳房、TP39 は左鎖骨上リンパ節および腹腔内リンパ節、TP44 は腰部および顎下リンパ節の皮下組織であった (Table 17)。中枢神経外再発の診断時には、5 例すべてにおいて中枢神経内に病変が検出されなかった。しかし、唯一患者 T1 においては、再発の診断後 1 ヶ月後の MRI において左前頭葉および左視神経における中枢神経内再発を確認した (Figure 14)。各患者の PCNSL および中枢神経外再発サンプルの腫瘍細胞含量をフローサイトメトリーまたは組織学的分析により測定した結果を Table 18 に示した。腫瘍試料から抽出された DNA の質は、Agilent FFPE QC キットを用いたリアルタイム定量 PCR の結果に基づいて算出し、Table 19 に掲載した。

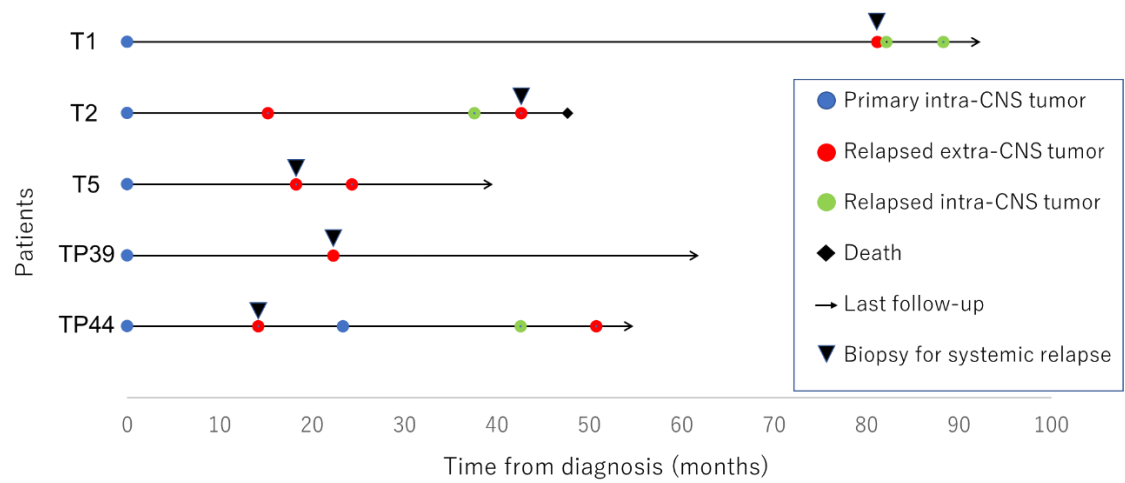


Figure 14 中枢神経外再発を来した 5 症例の臨床経過

Sample ID	Description of samples	Age, sex	Sample interval, (months)	Initial treatment	Sample original	Tumor size in CNS (cm)	Tumor number in CNS
T1-P	Primary	65,M		modified EORTC	CNS	5.0	1
T1-SR	Systemic relapse	71,M	81	R-MA	Maxillary sinus, Lymph node		
T2-P	Primary	68,M		modified EORTC	CNS	3.0	2
T2-SR	Systemic relapse	69,M	15	R-CHOP	Subcutaneous		
T5-P	Primary	71,F		modified EORTC	CNS	2.0	1
T5-SR	Systemic relapse	72,F	18	R-CHOP	Subcutaneous		
TP39-P	Primary	64,F		modified EORTC	CNS	2.5	≥3
TP39-SR	Systemic relapse	65,F	22	R-CHOP	Adrenal grand, Breast, Lymph node,		
TP44-P	Primary	61,F		modified EORTC	CNS	4.1	1
TP44-SR	Systemic relapse	62,F	14	R-CHOP	Lymph node, Subcutaneous		

Table 17 中枢神経外再発を来した 5 症例の臨床情報

Patient ID	Tumor type	Tumor cell percentage	Number of pathological spicemens
T1	Primary intra-CNS	20%	1
	Relapsed extra-CNS	1.09%※1	6
T2	Primary intra-CNS	70%	2
	Relapsed extra-CNS	80%	1
T5	Primary intra-CNS	70%	1
	Relapsed extra-CNS	10%	1
TP39	Primary intra-CNS	30%	4
	Relapsed extra-CNS	90%	1
TP44	Primary intra-CNS	80%	3
	Relapsed extra-CNS	80%	1
※1 Tumor cell count was determined by flowcytometry			

Table 18 中枢神経外再発を来した 5 症例の検体の腫瘍含有率

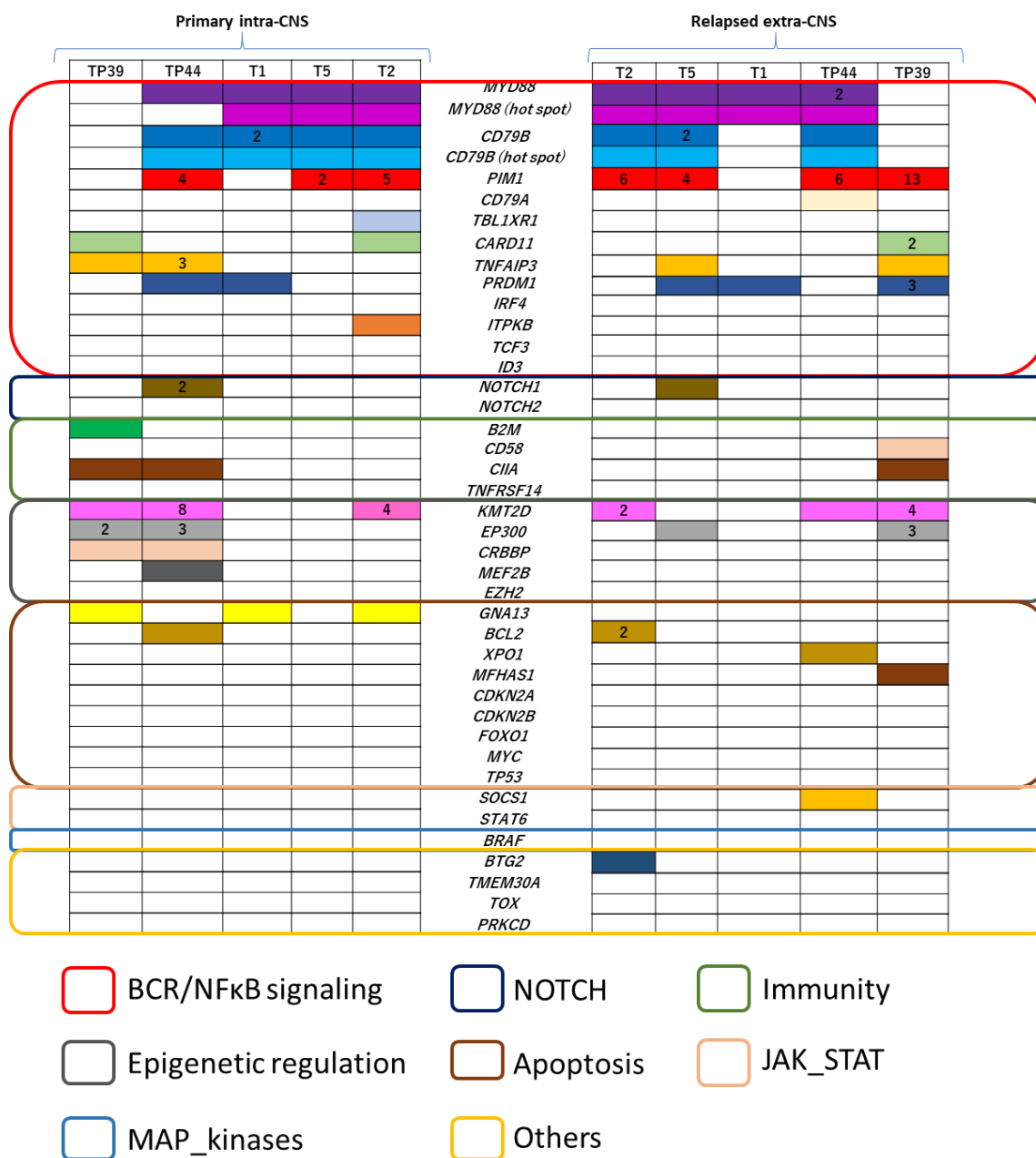
Patient ID	Tumor type	$\Delta \Delta CT$	Status of DNA
T1	Primary intra-CNS	0.39	Frozen tissue
	Relapsed extra-CNS	0.23	Frozen tissue
T2	Primary intra-CNS	0.01	Frozen tissue
	Relapsed extra-CNS	0.59	FFPE
T5	Primary intra-CNS	0.01	FFPE
	Relapsed extra-CNS	0.76	FFPE
TP39	Primary intra-CNS	0.55	FFPE
	Relapsed extra-CNS	0.42	FFPE
TP44	Primary intra-CNS	0.26	FFPE
	Relapsed extra-CNS	0.10	FFPE
FFPE, formalin-fixed, paraffin-embedded			

Table 19 5 症例の腫瘍サンプルの  $\Delta \Delta CT$

### 検出された体細胞変異

初発の PCNSL と、中枢神経外再発の腫瘍の Coverage の平均は、それぞれ 1593× (370～3099) および 1563× (1084～1990) であった。原発の PCNSL からは、53 の一塩基変異、7 の欠失、および 1 の挿入を含む 61 の体細胞変異が同定された。具体的には、*MYD88* (4/5)、*CD79B* (4/5)、*PIM1* (3/5)、*KMT2D* (3/5)、および *GNA13* (3/5) などの遺伝子において体細胞変異が認められた。

我々の研究における PCNSL の変異プロファイルは、PCNSL の変異解析に関する既報の結果と同じく、NF $\kappa$ B signaling pathway に関係する遺伝子における変異の頻度が有意に高かった<sup>22-26</sup>。中枢神経外再発病変において、57 の一塩基変異、8 の欠失および 3 の挿入を含む、68 の体細胞変異が同定された。具体的には、*MYD88* (4/5)、*CD79B* (3/5)、*PIM1* (4/5)、*KMT2D* (3/5)、および *PRDM1* (3/5) などの遺伝子が高頻度に認められた (Figure 15; Table 20)。



**Figure 15** 初発病変と中枢神経外再発病変の変異プロファイルの比較

ターゲットリシーケンスで 34 遺伝子を標的とした解析を行った。個々の症例で、変異が検出された遺伝子に色を付け、また遺伝子の機能ごとに分けて示した。同一遺伝子領域内に複数の変異を認める場合は数字を記入している。

Patient ID	Gene ID	Chrom	Position	Ref	Variant	cDNA Change	Protein Change	Allele frequency in Primary CNS tumor	Allele frequency in systemically relapsed tumor	Class
T1	MYD88	chr3	38182641	T	C	c.T794C	p.L265P	24.2	3.7	Shared
	PRDM1	chr6	106547292	C	T	c.C529T	p.Q177X	39.9	3.2	Shared
	CD79B	chr17	62006798	T	G	c.A587C	p.Y196S	7.1	0	intra-CNS specific
	CD79B	chr17	62006830	G	T	c.C555A	p.D185E	27	0	intra-CNS specific
T2	GNA13	chr17	63052509	ATCTGCTTCAGGA	-	c.191_203del	p.F64Cfs*24	22.5	0	intra-CNS specific
	MYD88	chr3	38182641	T	C	c.T794C	p.L265P	29.1	35.3	Shared
	CD79B	chr17	62006799	A	G	c.T586C	p.Y196H	31.5	36.6	Shared
	KMT2D	chr12	49426686	CT	GC	c.11801_11802GC	p.Q3934R	27.5	25.3	Shared
	KMT2D	chr12	49426635	CT	GC	c.11852_11853GC	p.Q3951R	22.3	37.7	Shared
	PIM1	chr6	37138769	C	G	c.C202G	p.H68D	35.3	39.4	Shared
	KMT2D	chr12	49426576	TGC	-	c.11904_11906del	p.Q3974del	14.5	0	intra-CNS specific
	ITPKB	chr1	226924610	T	A	c.A550T	p.S184C	24.3	0	intra-CNS specific
	CARD11	chr7	2977652	CTT	-	c.1030_1032del	p.K344del	24.7	0	intra-CNS specific
	PIM1	chr6	37139039	C	G	c.C379G	p.Q127E	27.1	0	intra-CNS specific
	GNA13	chr17	63052533	C	T	c.G179A	p.G60D	29	0	intra-CNS specific
	TBL1XR1	chr3	176756104	A	T	c.T1044A	p.H348Q	29.4	0	intra-CNS specific
	PIM1	chr6	37138968	T	G	c.T308G	p.V103G	30.7	0	intra-CNS specific
	PIM1	chr6	37138950	G	C	c.G290C	p.S97T	31	0	intra-CNS specific
	PIM1	chr6	37138624	A	C	c.A158C	p.Y53S	32.5	0	intra-CNS specific
	KMT2D	chr12	49445427	GT	AG	c.2038_2039CT	p.T680L	46	0	intra-CNS specific
	PIM1	chr6	37138987	G	A	c.G327A	p.W109X	0	26.6	extra-CNS specific
	PIM1	chr6	37139090	G	C	c.G430C	p.A144P	0	29.3	extra-CNS specific
	PIM1	chr6	37139203	G	-	c.543delG	p.E181Dfs*92	0	31.8	extra-CNS specific
	BCL2	chr18	60985861	C	G	c.G39C	p.E13D	0	35.1	extra-CNS specific
	BCL2	chr18	60985896	C	T	c.G4A	p.A2T	0	35.3	extra-CNS specific
	BTG2	chr1	203274808	G	C	c.G74C	p.R25T	0	39.1	extra-CNS specific
	PIM1	chr6	37138804	G	-	c.237delG	p.E79Dfs*14	0	53	extra-CNS specific
	PIM1	chr6	37138919	C	T	c.C259T	p.P87S	0	63	extra-CNS specific
T5	MYD88	chr3	38182641	T	C	c.T794C	p.L265P	46.3	7.4	Shared
	CD79B	chr17	62006799	A	G	c.T586C	p.Y196H	58.8	15.8	Shared
	PIM1	chr6	37139037	TGC	-	c.377_379del	126_Q127delir	90.6	22.1	Shared
	PIM1	chr6	37138329	G	A	c.G251A;p.C84Y	p.C84Y	83.2	0	intra-CNS specific
	PRDM1	chr6	106553656	CC	AA	c.1621_1622AA	p.P541N	0	6	extra-CNS specific
	PIM1	chr6	37138642	C	T	c.C176T	p.S59F	0	6.6	extra-CNS specific
	TNFAIP3	chr6	138202260	C	A	c.C2177A	p.A726D	0	8.1	extra-CNS specific
	SOC1	chr16	11348713	G	A	c.C623T	p.P208L	0	9.9	extra-CNS specific
	CD79B	chr17	62006614	G	T	c.C662A	p.S221Y	0	10.5	extra-CNS specific
	XPO1	chr2	61719529	G	T	c.C1654A	p.P552T	0	11.1	extra-CNS specific
	NOTCH1	chr9	139390930	-	CGAGAC	c.7261_7262insGTCTCG	2420_V2421ins	0	11.5	extra-CNS specific
	EP300	chr22	41536152	C	T	c.C1769T	p.A590V	0	14.2	extra-CNS specific
	CD79A	chr19	42384737	A	C	c.A499C	p.K167Q	0	18	extra-CNS specific
T5	PIM1	chr6	37138769	C	T	c.C202T	p.H68Y	0	21.1	extra-CNS specific
	PIM1	chr6	37138633	T	G	c.T167G	p.I56S	0	43	extra-CNS specific

**Table 20 Ion Ampliseq による初発及び中枢神経外再発病変の体細胞変異の確認**

代表的な 34 遺伝子を標的とした解析をターゲットリシーケンスで行った。

Extra-CNS specific; 中枢神経外再発病変に特異的に検出された変異、intra-CNS specific; shared; 初発の中枢神経内病変に特異的に検出された変異、初発と中枢神経外再発病変の両方から検出される変異、

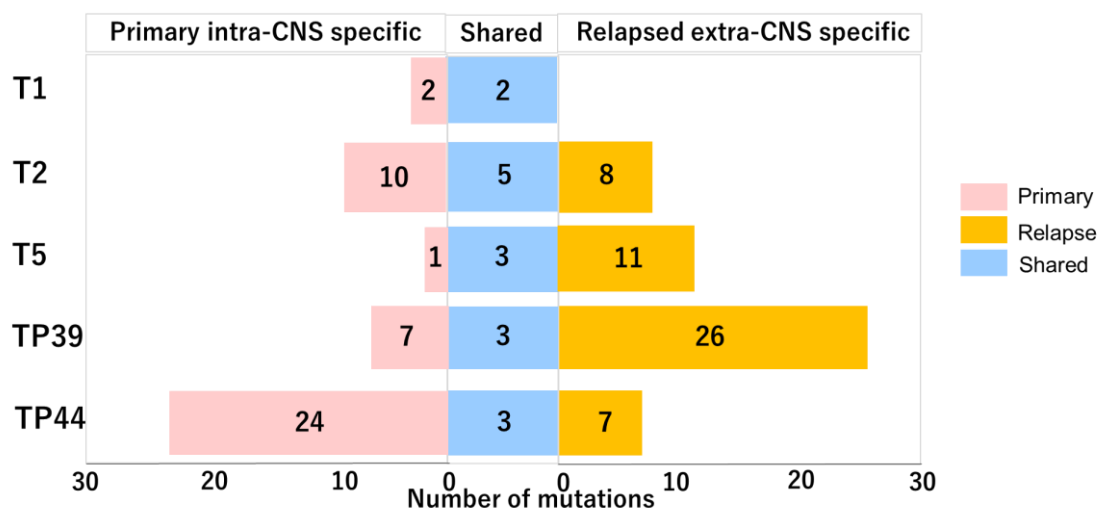
Patient ID	Gene ID	Chrom	Position	Ref	Variant	cDNA Change	Protein Change	Allele frequency in Primary CNS tumor	Allele frequency in systemically relapsed tumor	Class
TP39	CARD11	chr7	2984112	GC	AT	c.417_418AT	Q140_L1154d	13	6.1	Shared
	EP300	chr22	41574673	-	CCC	c.6957_6958insCCC	Y2319_S2320ir	24.1	32	Shared
	KMT2D	chr12	49426635	CT	GC	c.11852_11853GC	p.Q3951R	46.6	41.9	Shared
	TNFAIP3	chr6	138202260	C	A	c.C2177A	p.A726D	5.2	0	intra-CNS specific
	B2M	chr15	45003778	CTACTCT	-	c.34_40del	p.L13Ffs*28	8.7	0	intra-CNS specific
	B2M	chr15	45003765	AGCTGTGCTC	-	c.21_30del	p.A8Rfs*32	9.2	0	intra-CNS specific
	CREBBP	chr16	3778823	C	G	c.G6225C	p.K2075N	12.6	0	intra-CNS specific
	GNA13	chr17	63010636	G	T	c.C873A	p.N291K	12.9	0	intra-CNS specific
	CIITA	chr16	11017126	T	A	c.T3359A	p.L1120Q	16.3	0	intra-CNS specific
	EP300	chr22	41573563	A	T	c.A5848T:p.R1950W	p.R1950W	32.4	0	intra-CNS specific
	PIM1	chr6	37139097	G	A	c.G437A	p.S146N	0	4.6	extra-CNS specific
	PIM1	chr6	37139053	C	G	c.C393G	p.D131E	0	6.8	extra-CNS specific
	PIM1	chr6	37140929	C	-	c.765delC	p.F255Lfs*18	0	6.9	extra-CNS specific
	PRDM1	chr6	106547337	G	T	c.G574T	p.A192S	0	8	extra-CNS specific
	PRDM1	chr6	106547332	-	TC	c.568_569insTC:p.P191Sfs*	p.P191Sfs*26	0	9	extra-CNS specific
	PRDM1	chr6	106547340	A	G	c.A577G	p.N193D	0	9.1	extra-CNS specific
	MFHAS1	chr8	8748716	A	T	c.T1853A	p.L618Q	0	10.6	extra-CNS specific
	KMT2D	chr12	49426683	T	G	c.A11805C:p.Q3935H	p.L1805C:p.Q3935H	0	11.3	extra-CNS specific
	KMT2D	chr12	49426096	G	A	c.C12392T:p.P4131L	p.C12392T:p.P4131L	0	12.1	extra-CNS specific
	KMT2D	chr12	49426686	CT	GC	c.11801_11802GC	p.Q3934R	0	12.7	extra-CNS specific
	CIITA	chr16	10997650	A	T	c.A835T	p.T279S	0	12.9	extra-CNS specific
	EP300	chr22	41523503	G	T	c.G919T	p.A307S	0	14	extra-CNS specific
	EP300	chr22	41574721	T	G	c.T7006G	p.S2336A	0	19.9	extra-CNS specific
	PIM1	chr6	37138946	G	A	c.G286A	p.V96M	0	22.7	extra-CNS specific
	PIM1	chr6	37138950	G	A	c.G290A	p.S97N	0	23.2	extra-CNS specific
	PIM1	chr6	37139201	GAGCTCA	-	c.541_547del	p.E181Sfs*90	0	37.9	extra-CNS specific
	PIM1	chr6	37139247	C	T	c.C587T	p.T196I	0	39.2	extra-CNS specific
	CARD11	chr7	2983885	C	A	c.G645T	p.K215N	0	40.2	extra-CNS specific
	PIM1	chr6	37139180	C	T	c.C520T	p.L174F	0	41.5	extra-CNS specific
	PIM1	chr6	37138916	G	T	c.G256T	p.V86L	0	46.6	extra-CNS specific
	PIM1	chr6	37139223	G	C	c.C563C	p.G188A	0	46.6	extra-CNS specific
	PIM1	chr6	37138901	C	T	c.C241T	p.P81S	0	46.7	extra-CNS specific
	PIM1	chr6	37139073	C	T	c.C413T	p.A138V	0	54.4	extra-CNS specific
	PIM1	chr6	37138769	C	T	c.C202T	p.H68Y	0	61	extra-CNS specific
	CD58	chr1	117078621	T	-	c.594delA	p.S199Qfs*3	0	69.9	extra-CNS specific
	TNFAIP3	chr6	138192655	G	-	c.291delG	p.N98Tfs*24	0	78	extra-CNS specific
TP44	MYD88	chr3	38182337	C	T	c.C770T	p.P258L	38.4	41.3	Shared
	CD79B	chr17	62006798	T	C	c.A587G	p.Y196C	86.5	82.3	Shared
	PIM1	chr6	37139180	C	G	c.C520G	p.L174V	44.1	41	Shared
	TNFAIP3	chr6	138199874	C	T	c.C1292T	p.P431L	5.2	0	intra-CNS specific
	KMT2D	chr12	49416411	C	T	c.G16300A	p.E5434K	5.3	0	intra-CNS specific
	KMT2D	chr12	49427447	G	A	c.C11041T:p.Q3681X	p.C11041T:p.Q3681X	5.3	0	intra-CNS specific
	PRDM1	chr6	106553328	G	A	c.G1293A	p.M431I	5.5	0	intra-CNS specific
	TNFAIP3	chr6	138197201	C	T	c.C703T	p.P235S	5.6	0	intra-CNS specific
	EP300	chr22	41572452	C	T	c.C4981T	p.Q1661X	5.7	0	intra-CNS specific
	TNFAIP3	chr6	138199650	G	A	c.G1068A	p.W356X	6.4	0	intra-CNS specific
	CREBBP	chr16	3777936	G	A	c.C7112T	p.P2371L	6.5	0	intra-CNS specific
	NOTCH1	chr9	139391316	C	T	c.G6875A	p.G2292E	6.5	0	intra-CNS specific
	PIM1	chr6	37139093	CG	TT	c.433_434TT	p.R145F	9.1	0	intra-CNS specific
	EP300	chr22	41574076	C	T	c.C6361T	p.Q2121X	10.2	0	intra-CNS specific
	KMT2D	chr12	49424179	G	A	c.C13883T	p.P4628L	10.4	0	intra-CNS specific
	BCL2	chr18	60985547	T	A	c.A353T	p.Q118L	11.2	0	intra-CNS specific
	KMT2D	chr12	49424159	G	A	c.C13903T	p.Q4635X	11.3	0	intra-CNS specific
	NOTCH1	chr9	139391205	C	T	c.G6986A	p.S2329N	11.7	0	intra-CNS specific
	KMT2D	chr12	49445577	G	A	c.C1889T	p.P630L	11.8	0	intra-CNS specific
	KMT2D	chr12	49444876	G	A	c.C2590T	p.P864S	11.9	0	intra-CNS specific
	CIITA	chr16	11001991	G	A	c.G2642A	p.C881Y	12	0	intra-CNS specific
	MEF2B	chr19	19260054	G	T	c.C239A	p.T80N	12.4	0	intra-CNS specific
	KMT2D	chr12	49445086	C	T	c.G2380A	p.G794R	12.5	0	intra-CNS specific
	KMT2D	chr12	49426896	G	C	c.C11592G:p.H3864Q	p.C11592G:p.H3864Q	12.7	0	intra-CNS specific
	EP300	chr22	41572350	C	T	c.C4879T	p.R1627W	17.2	0	intra-CNS specific
	PIM1	chr6	37138639	TCTCCGA	-	c.173_179del	p.V58fs	34.7	0	intra-CNS specific
	PIM1	chr6	37139033	C	T	c.C373T	p.P125S	53.8	0	intra-CNS specific
	PIM1	chr6	37139084	G	A	c.G424A	p.E142K	0	3.8	extra-CNS specific
	MYD88	chr3	38182641	T	C	c.T794C	p.L265P	0	6.7	extra-CNS specific
	KMT2D	chr12	49427665	T	A	c.A10823T:p.Q3608L	p.A10823T:p.Q3608L	0	14.9	extra-CNS specific
	PIM1	chr6	37138355	C	G	c.C4G	p.L2V	0	34.8	extra-CNS specific
	PIM1	chr6	37138901	C	T	c.C241T	p.P81S	0	39.4	extra-CNS specific
	PIM1	chr6	37139210	C	T	c.C550T	p.L184F	0	40.3	extra-CNS specific
	PIM1	chr6	37138906	TGG	-	c.246_248del	p.G83del	0	42.5	extra-CNS specific

Table 20 のつづき

## 原発 PCNSL の病変と中枢神経外再発病変における変異プロファイルの特徴及び比較

全 5 ペアの初発及び中枢神経外再発腫瘍において、初発時と再発時に共通して検出される体細胞変異が確認された (Figure 15, 16)。 具体的には、合計で 11 遺伝子の 16 の変異が共有されていた (Figure 16, Table 20)。 *MYD88* 遺伝子の変異は 5 ペア中 4 ペアにおいて共有されており、うち *MYD88* L265P は 3 ペア、*MYD88* P258L が 1 ペアにおいて初発再発で共通して認められた。また、*CD79B* (3/5)、*KMT2D* (3/5) および *PIM1* (2/5) の体細胞変異も初発と中枢神経外再発病変とで共通して検出され、*CD79B* と *KMT2D* についてはホットスポットである *CD79B* Y196 (3/5) および *KMT2D* Q2951R (2/5) が変異として検出された (Figure 15, Table 20)。 *GNA13*、*CREBBP* 及び *TBL1XR1* を含む 6 つの遺伝子における 45 の変異は、原発の PCNSL の病変に特異的であり、これらの変異は中枢神経外再発病変においては検出されなかった (Figure 15,16, Table 20)。 一方で、*SOCS1* や *CD58* などを含む 6 つの遺伝子における 52 の変異が中枢神経外再発病変に特異的に検出され、逆にこれらは原発の PCNSL の病変からは検出されなかった (Figure 15,16, Table 20)。





**Figure 16** 初発と中枢神経外再発病変との体細胞変異数の比較

Primary intra-CNS specific; 初発の中枢神経内病変にのみ検出された変異、Relapsed extra-CNS specific; 中枢神経外再発病変にのみ検出された変異、Shared; 初発と中枢神経外再発の両方で検出された変異、

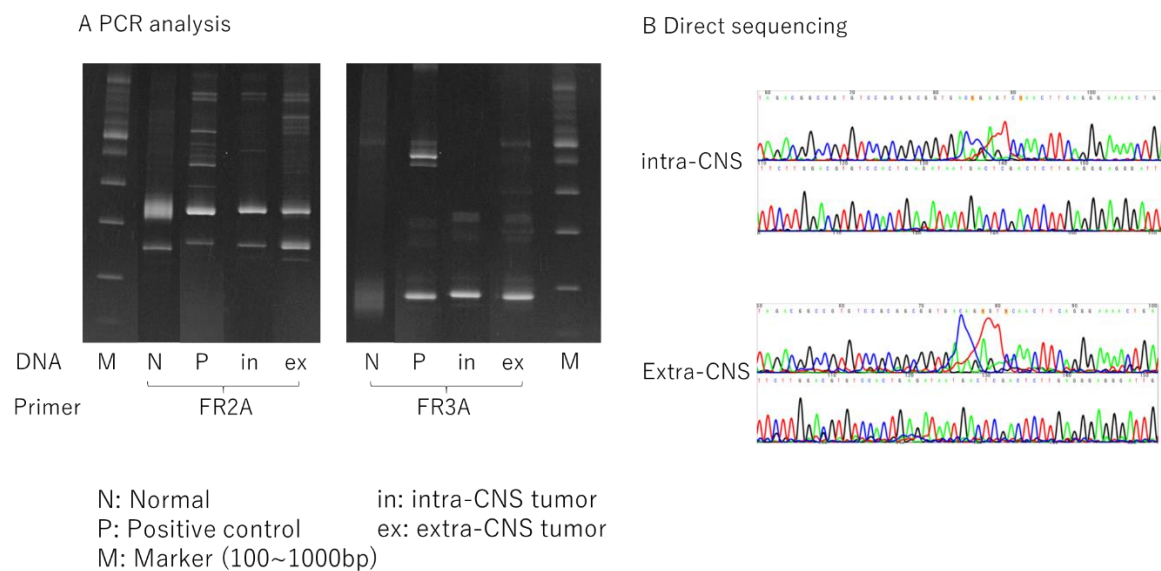
## CPC から初発及び中枢神経外再発腫瘍への進展

同一症例において初発再発検体に共通する遺伝子異常が検出されたことや、初発時に見られた遺伝子異常のうち一部が、再発時に消失しているという結果が得られたことから、再発腫瘍が残存初発腫瘍から直接進展したのではなく、初発腫瘍より遺伝子異常の少ない腫瘍前駆細胞から生じていることが推測された。

初発の PCNSL 腫瘍と中枢神経外再発病変との間で認められたこのような体細胞性変異の分布パターンは、PCNSL の発生に先行する共通腫瘍前駆細胞

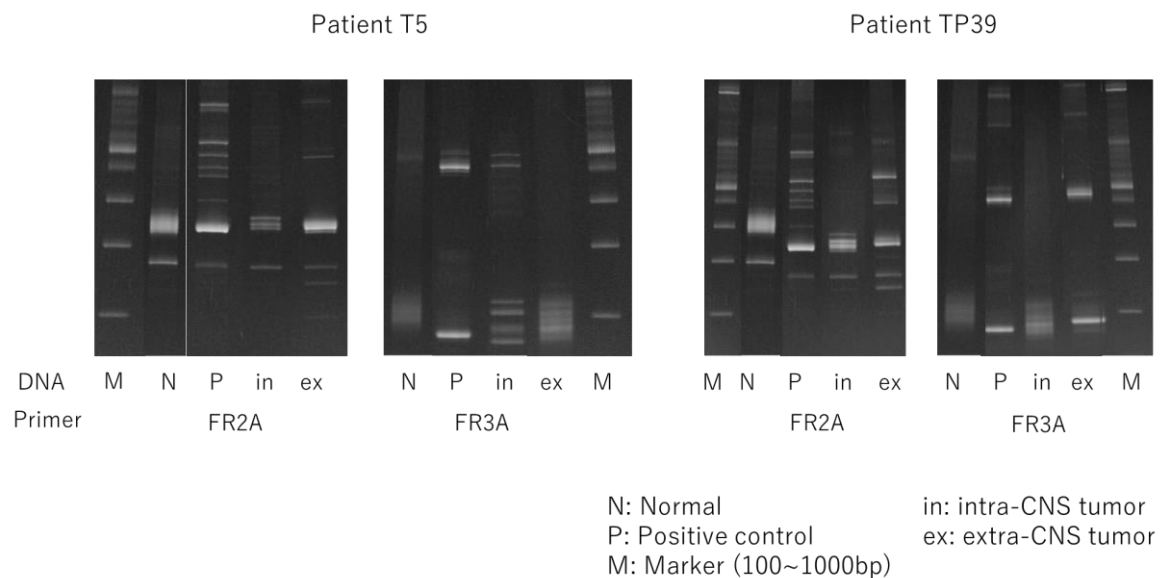
(common precursor cell: CPC) の存在を示唆している。B 細胞の分化段階における CPC の局在を調べるために、T1、T5、および TP39 の初発-中枢神経外再発のペアサンプルにおいて、IgH 再構成の状態を調べて比較した (Figure 17, 17)。T1 のペアサンプルにおいては、IgH の CDR3 領域の PCR 産物をアクリルアミドゲルで電気泳動した所、その両方において同じサイズのモノクローナルバンドを認めた (Figure 17)。また、ダイレクトシーケンスにより、両方の腫瘍が同一の配列を共有することが確認された (Figure 17)。その一方で、T5 および TP39 においては、泳動ではポリクローナルなバンドが確認された。同様にダイレクトシーケンスをこれらの PCR 産物に対して行ったが、波形を確認できず、配列を決定することができなかった (Figure 18)。そのため、これらの PCR 産物をプラスミドにクローニングし、大腸菌コロニーから回収された 20 個

のクローンのそれぞれに対してダイレクトシーケンスを行って、各々の配列を基にして免疫グロブリン重鎖遺伝子再構成のパターン(VH-DH-JH の組み合わせ)を確認した。尚、ダイレクトシーケンスの配列を本章の P114-128 に、Supplementary Figure として提示した。



**Figure 17 T1 のペアサンプルにおける IgH rearrangement の比較**

- A. CDR3 領域の PCR 産物に対してアクリルアミドゲルで電気泳動を施行し、初発と中枢神経外再発病変とで比較したところ、同じ長さのバンドが確認された。
- B. PCR 産物に対してダイレクトシーケンスを行い、配列を比較したところ、初発と中枢神経外再発とで同一の配列であった。



**Figure 18 T5、TP39 のペアサンプルにおける IgH rearrangement の比較**

CDR3 領域の PCR 産物に対してアクリルアミドゲルで電気泳動を施行し、初発と中枢神経外再発病変とで比較したところ、初発と再発でバンドのパターンは異なっていた。

まず全てのサンプルの IgH クローンにおいて、V 遺伝子は VH3 または VH4 ファミリーのいずれかに分類された (Table 21)。T5 のペアサンプルで、初発の腫瘍においては 20 個弱のクローンのうち大部分が VH3 ファミリーの VH 遺伝子 (VH3-23 \* 04、V3-72 \* 01、または V3-30-3 \* 03) にマッピングされ、他方で中枢神経外再発の腫瘍については殆どのクローンが VH4 遺伝子にマッピングされた (原発腫瘍、VH3 16/18 [89%] vs VH4 2/18 [11%]; 中枢神経外再発腫瘍、VH3 3/17 [18%] vs VH4 14/17 [82%]) (Table 21)。TP39 においては、原発腫瘍は殆どが VH4 ファミリーの VH4-4 \* 07、中枢神経外再発腫瘍においては全てのクローンが VH3 ファミリーの VH3-21 \* 01 に分類されていた (原発腫瘍、VH3 1/17 [6%] vs VH4 16/17 [94%]; 中枢神経外再発腫瘍、VH3 18/18 [100%] vs VH4 0/100 [0%]) (Table 21)。Germline の配列との相同性および VH-DH-JH 遺伝子についての情報を Table 21 および Supplementary Table に要約した。T5、TP39 の両方のペアサンプルにおいて、ドミナントクローンが確認された。T5 の初発腫瘍では、VH3-23 \* 01 / DH4-23 \* 01 / JH6 \* 02 に分類されたクローンおよび VH3-72 \* 01 / DH6-25 \* 01 / JH6 \* 03 のクローンが 4 / 18 [22%] および 4/18 [22%] であり、これらがドミナントクローンであった (Table 21)。一方で、T5 の中枢神経外再発腫瘍においては、殆どのクローン (14/17 [82%]) が VH4-4 \* 07 / DH5-24 \* 01 / JH4 \* 01 クローンに分類されていた。

TP39 においては、初発腫瘍のクローンは 16/17 [94%]が VH4-4 \* 07 / DH5-24 \* 01 / JH4 \* 01 に、中枢神経外腫瘍クローンは 15/18 [83%]が VH3-21 \* 01 / DH6-19 \* 01 / JH4 \* 01]に分類された (Table 21)。また、ほぼ全ての IgH クローンにおいて変異が認められており、こちらは B リンパ球の免疫グロブリン遺伝子における生理的な DNA 改変機構の 1 つである、可変領域の遺伝子変異 (somatic hypermutation: SHM) の影響と考えられた<sup>69-72</sup> (Table 21、Supplementary Table)。

これらの解析結果は、PCNSL の CPC が B 細胞分化段階の中で症例毎に別々の位置にマッピングされている可能性があることを示唆している。つまり、T1 の初発-中枢神経外再発腫瘍のペアサンプルにおいては、IgH rearrangement の後の段階で CPC から分岐し初発及び再発腫瘍へ派生している可能性が示唆されたが、同時に IgH rearrangement の前の段階で CPC からの分岐が起きうることが T5 および TP39 において示唆された。

Patient	Sample		VDJ rearrangement	GL sequences of Vhgene (%)
T1	intra-CNS		V4-4*07 / D no results / J no results	81.18
T1	extra-CNS		V4-4*07 / D no results / J no results	84.07
usage of VH genes				VH3 0/1 (0%), VH4 1/1 (100%)

Patient	Sample		VDJ rearrangement	No of colonies analyzed (total)	Range of homology to GL (%)
T5	intra-CNS		V3-23*01 / D4-23*01 / J6*02	4	91.63-92.09
			V3-72*01 / D6-25*01 / J6*03	4	88.06-89.55
			V3-23*01 / D no results / J5*01	2	81
			V3-30-3*01 / D3-16*01 / J3*02	2	91.22
			V3-30-3*01 / D3-9*01 / J4*01	1	89.11
			V3-23*01 / D2-2*01 / J6*02	1	98.11
			V3-23*01 / D3-3*01 / J3*02	1	91.41
			V3-23*01 / D6-19*01 / J4*01	1	91.1
			V4-4*07 / D3-3*02 / J6*03	1	84.26
			V4-4*07 / D5-24*01 / J5*01	1	92.11
usage of VH genes				VH3 16/18 (89%), VH4 2/18 (11%)	
T5	extra-CNS		V4-4*07 / D5-24*01 / J4*01	14(17)	86.77-87.83
			V3-7*01 / D2-21*02 / J6*02	3(17)	97.72
usage of VH genes				VH3 3/17 (18%), VH4 14/17 (82%)	

Patient	Sample		VDJ rearrangement	No of colonies analyzed (total)	Range of homology to GL (%)
TP39	intra-CNS		V4-4*07 / D5-24*01 / J4*01	16(17)	76.72-88.36
			V3-7*01 / D2-21*01 / J4*01	1(17)	93
usage of VH genes				VH3 1/17 (6%), VH4 16/17 (94%)	
TP39	extra-CNS		V3-21*01 / D6-19*01 / J4*01	15(18)	77.61-82.09
			V3-71*03 / D2-21*01 / J3*02	1(18)	89.9
			V3-33*01 / D3-16*01 / J3*01	1(18)	96.21
			V3-33*01 / D2-15*01 / J4*01	1(18)	88.02
usage of VH genes				VH3 18/18 (100%), VH4 0/18 (0%)	

**Table 21 VDJ rearrangement の比較 (Patient T5&TP39)**

T5、TP39 の初発及び再発病変のサンプルの PCR 産物に対してクローニングを行い、各クローンの VDJ 遺伝子再構成の組み合わせを確認した。

GL; germ line,

### ddPCR を用いた BMMNC/PBMNC における *MYD88* L265P 変異の確認

PCNSL の起源であると予想された CPC の局在について確認するため、骨髄及び末梢血中の単核球に対して、*MYD88* L265P をターゲットとした ddPCR を行った。具体的には、中枢神経外再発の診断時に収集された T1 の末梢血単核球及び、23 症例分（中枢神経外再発した T1、T2 及び T5 を含む）の PCNSL 患者の BMMNC（N = 24）に対する解析を行った。これらの 24 サンプルの症例全てにおいて、原発の PCNSL の病変にて *MYD88* L265P 変異が確認されている。病理学的診断では、これらの患者の骨髄においてリンパ腫浸潤を示唆する所見は認められなかったが、*MYD88* L265P 変異は、PBMNC（T1）および 23 の BMMNC のうち 9 つ（合計 24 サンプルのうち 10 サンプル）において ddPCR によって同定されたが、TDS による解析ではいずれの試料においても検出されなかった（Table 22）。



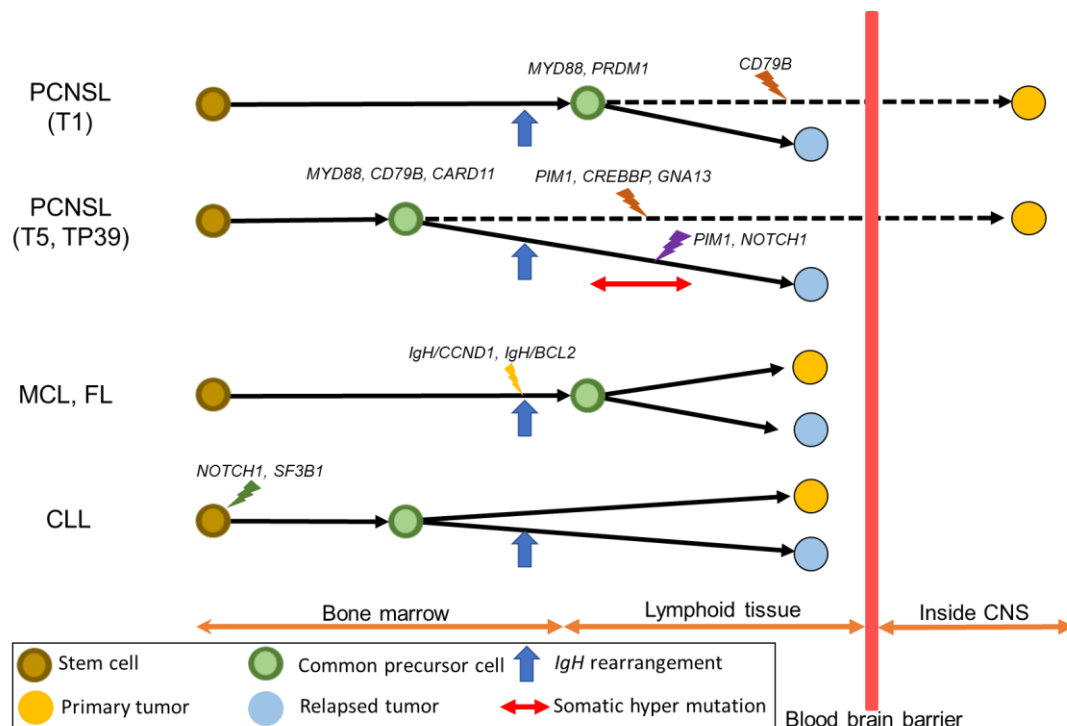
L265P <i>MYD88</i> variant allele frequency (%)						
Patient ID	CNS tumor		BMMNCs		PBMNCs	
	TDS	ddPCR	TDS	ddPCR	TDS	ddPCR
T1	24.2	N/P	0	0	0	0.49
T2	31.8	N/P	0	0		
T5	44.2	N/P	0	0		
T9	34.1	N/P	0	0		
TP25	24.2	N/P	0	0		
TP28	22.8	N/P	0	0.08		
TP31	38.2	N/P	0	0.07		
TP36	69.2	N/P	0	0		
TP40	30.6	N/P	0	0		
TP42	39.2	N/P	0	0		
TP48	43.1	N/P	0	0.16		
TP51	34.5	N/P	0	0.14		
TP89	35.1	N/P	0	0		
TP92	53.3	N/P	0	0.61		
TP94	61.3	N/P	0	0		
TP95	36.4	N/P	0	0.08		
TP96	56.1	N/P	0	0		
TP98	88.7	87	N/P	0.12		
TP99	56.6	55.9	N/P	0.08		
TP100	75.2	79	N/P	0		
TP101	9.2	10.5	N/P	0.12		
TP102	43	38.3	N/P	0		
TP103	19.7	17.1	N/P	0		

Table 22 骨髄/末梢血中の単核球における *MYD88* L265P 変異の有無

N/P; not performed; 施行せず、TDS; targeted deep sequencing; ddPCR; droplet digital PCR

#### 4.4 考察

過去の癌に対するゲノム解析研究において、初発病変と再発病変の変異プロファイルと比較する研究は数多く行われているが、PCNSLにおいては中枢神経内の原発巣病変と中枢神経外再発病変との変異プロファイルと比較する解析は、本研究が初めてである。5 ペアのすべてが初発と中枢神経外再発の病変の間で、複数の遺伝子変異が共有されていた。また、5 サンプルの初発の PCNSL において、いくつかの変異は中枢神経外再発時には検出されなくなっていた。更に、中枢神経外再発病変 5 サンプルの内、4 サンプルにおいては初発時には認められなかった遺伝子変異が観察された (Figure 15,16, Table 20)。初発の PCNSL の病変に特異的に検出された体細胞変異のうち、*TBL1XR1* 遺伝子の変異については、全身性に発症した DLBCL よりも PCNSL に高頻度に検出されると報告されている<sup>22</sup>。一方、*TP44* の皮下組織に認められた中枢神経外再発病変で検出された。*SOCS1* 変異は、原発性皮膚びまん性大 B 細胞リンパ腫、足型においてより高頻度に検出されることが知られている<sup>73</sup>。したがって、これらの遺伝子の体細胞変異は、再発部位の特徴を反映している可能性がある。これらの結果は、PCNSL の原発病変と中枢神経外再発病変が、CPC からそれぞれ異なる変異の蓄積を通じてお互い独立して腫瘍へ進展していった可能性を示唆している。最近の研究では、いくつかの血液癌における原発性および再発性の腫瘍が



**Figure 19** CPC から初発及び再発病変への分岐パターン

本研究において解析対象となった T1、T5、TP39 における、CPC から初発及び再発腫瘍への分岐パターンを、MCL,FL,CLL のそれと比較した。

Stem cell; 幹細胞, Common precursor cell; 腫瘍前駆細胞 (CPC), IgH rearrangement; 免疫グロブリン重鎖遺伝子再構成、Primary tumor; 初発病変、Relapsed tumor; 再発病変、Somatic hyper mutation; 超体細胞性変異

CPC から生じる可能性があることが報告されている<sup>65-66, 73-75</sup>。MCL および FL において、初発時と再発時に共通した遺伝子異常が認められたのと、初発時に認めていた遺伝子変異の一部が再発時には消失しているという結果が得られ、またこれらの免疫グロブリン重鎖遺伝子再構成 (VH-DH-JH) は初発と再発病変とで同一であった。これらの結果より、CPC の存在が示唆されたと同時に、IgH 再構成の後に MCL や FL の CPC が生じる可能性があることを示唆していると

考えられる (Figure 19)<sup>65-66</sup>。慢性リンパ性白血病 (Chronic lymphocytic leukemia; CLL)においても同様の解析について報告されている。CLLは、低悪性度 B 細胞リンパ腫として分類され、その多くは緩徐な経過を辿るが、2~10%の割合で増殖が速い腫瘍として再発することがあり、この状態は Richter 症候群と定義されている<sup>76</sup>。Richter 症候群の一部では、原発の CLL の病変と再発した病変との間で異なる VDJ 遺伝子再構成が観察され、VDJ 再編成の前に CPC が出現し、腫瘍への進展が起こることが示唆された (Figure 19)<sup>74-75</sup>。本研究では、T1 の中枢神経外の再発病変および原発の PCNSL 病変の両方の CPC は、FL および MCL の場合のように IgH 再構成の後に CPC が生じ、その後に初発及び再発腫瘍への進展が起こり得ることを示唆する (Figure 19)。その一方で、患者 T5 および TP39 の腫瘍内および腫瘍外には異なる IgH クローンが観察され、CLL における Richter 症候群の場合と同様に、骨髄内における VDJ 再構成に先立って CPC から初発及び中枢神経外再発病変への進展が起こりうることを示唆された (Figure 19)<sup>74-75</sup>。McCann らの既報では、3 人の PCNSL 患者の末梢血または骨髄において PCNSL の原発腫瘍と同じ VDJ 再構成を有する IgH クローンが検出されたと報告されている<sup>77</sup>。これは、CPC から腫瘍への進展が、この 3 人患者全員において VDJ 再編成の後に起きていた可能性があり、これは、本研究における患者 T1 の場合と同様のパターンである。その一方で、T5 お

よび TP39 の場合は、VDJ 再構成のタイプがが原発の PCNSL の腫瘍と中枢神経外再発病変との間で異なっており、こちらは既報にはないパターンであり、注目すべき結果である。言い換えれば、これら 2 患者の場合は CPC から腫瘍への分岐が VDJ 再構成よりも前のタイミングで起きている可能性を示唆しており、VDJ 再構成が骨髄の中で起きる現象であることも踏まえて考えると、CPC が骨髄に存在する可能性があるということが推測できる。

B 細胞リンパ腫において認められる IgH と他の遺伝子との転座の中でも IgH / BCL2 と IgH/CCND1 はそれぞれ濾胞性リンパ腫 (follicular lymphoma : FL) とマントル細胞リンパ腫 (mantle cell lymphoma : MCL) に特異的であり、これらの転座は骨髄内で VDJ 再構成が起きるプレ B 細胞の段階で生じることが報告されている。いくつかのタイプのリンパ腫においては、B 細胞または T 細胞への分岐点よりも更に上流の造血幹/前駆細胞のタイミングで first hit として発現し、腫瘍細胞の増殖や維持に関与するとされる遺伝子変異が同定されている。

CLL における *NOTCH1* および *SF3B1* 変異<sup>78</sup>、毛状細胞白血病における *BRAF* 変異<sup>79</sup> および *TET2* / *DNMT3A* の血管免疫芽球性 T 細胞リンパ腫における変異などがその例である<sup>80-82</sup>。本研究において、コホート 2 を対象とした解析において、骨髄中の BMMNCs において *MYD88* L265P 変異が頻繁に検出された

ことは、PCNSL 患者において同変異が B 細胞分化プロセスの前または最中に細胞が骨髄環境を離れる前に起こり、その後ナイーブ成熟 B リンパ球として末梢リンパ器官に移動することを示唆する。

本研究を通して、PCNSL の中枢神経外再発腫瘍が残存初発腫瘍からではなく、初発腫瘍より遺伝子異常の少ない前駆細胞から生じていることが推測され、腫瘍前駆細胞（CPC）の存在が示唆された。更に、これにより中枢神経外において PCNSL の起源が存在する可能性を支持する結果を得られた。*MYD88* が早い段階での遺伝子イベントということが分かり、腫瘍の発症にかかわる遺伝子異常の一つである可能性が考えられる。ここで、研究 1 の結論の部分でも言及した、PCNSL における *MYD88* 変異の位置づけについて再度考察をしたい。臨床的な面で考えると、iburitinib の効果は Systemic DLBCL よりも PCNSL の方が高いことが知られている<sup>40</sup>。これは、PCNSL における *MYD88* は、早期に発現しているのみならず、依存度が Systemic DLBCL よりも高い可能性があることを示唆している。ただ、その一方で、ibrutinib による無再発生存期間は平均で 5 カ月程度であり<sup>40-41</sup>、BTK を阻害するのみでは治療として不十分である可能性が示唆され、PCNSL が *MYD88* L265P 変異に 100%依存しているわけではないことが考えられた。実際には、*MYD88* 変異に伴う BCR/NF $\kappa$ B signaling pathway の活性化以外の分子病態が積み重なった結果、PCNSL が発症してい

ると考えられる。

NF $\kappa$ B signaling pathway 以外の要因を考える上で重要となるのが、免疫環境の違いである。過去の PCNSL に関する変異解析の論文においては、*B2M* や *CD58*, *HLA-A/-B* などの免疫制御に関係する遺伝子において PCNSL の半数近くの割合で変異を認めたこと (Braggio, Clinical Cancer Research 2015) や<sup>24</sup>、*PDL-1* の発現上昇やゲノム増幅を半数以上の割合で認めたこと (Chapuy, Blood 2016)<sup>83</sup> などが既に報告されている。また PCNSL では腫瘍細胞がエンドセリン B 受容体及び CXCL13 を介して腫瘍浸潤リンパ球中の cytotoxic T cell を調整することで、宿主側の免疫を回避することが報告されている (Sugita, Brain 2015)<sup>84</sup>。これらのことから、PCNSL においては遺伝子異常に伴う免疫エスケープも病態に深く関係している可能性が考えられる。

具体的には、本研究において得られた結果や既報に基づいたエビデンスを断片的につなぎ合わせて考えると、次のようなストーリーを描くことができる。つまり、頭蓋外の CPC が更に変異を重ねて腫瘍化していく過程で免疫回避能を獲得し、免疫学的寛容部位である中枢神経に侵入し、続いてサイトカインやケモカインを分泌することにより周囲の免疫細胞を調節することで、宿主側の免疫を回避して局所増殖を起こすと推測することができる。このことから、PCNSL の微小腫瘍環境では特異的な炎症細胞の分布を認めることが予想される。腫瘍細

胞・中枢神経内の免疫細胞の相互作用について明らかにし、その上でそれらの PCNSL 発症における役割や分子メカニズムなどについて特定していくことが今後の課題である。

一方で、本研究において骨髄中の単核球細胞の ddPCR での解析の際に、リンパ腫細胞の存在が免疫組織化学的評価およびフローサイトメトリーによって除外されたとはいえ、これらの検査の検出感度以下の微小な割合で骨髄におけるリンパ腫の浸潤の可能性が完全に除外されていないのが現状である。また、健常者の *MYD88* L265P 変異の存在の有無については、利用可能な検体が無かったため本研究では解析ができなかった。過去の報告で、*MYD88*L265P 変異は、精神医学的疾患を有する 12,380 人の患者のコホートの中で 1 人だけ、PBMNC から 23% の VAF で検出された<sup>85</sup>。17,182 人の別の大きなコホートにおいては同変異を有する患者は確認されなかった<sup>86</sup>。しかし、両方の研究において変異の対立遺伝子頻度のカットオフレベルが 2%であったため、より小さな VAF の検体が検出から免れた可能性がある。従って、*MYD88* L265P を有する非常に少数の細胞が健康な個体でさえも存在するという可能性を完全に排除することはできておらず、こちらは今後解明していくべき課題である。

結論として、本研究のデータは、PCNSL の原発腫瘍および中枢神経外再発腫



瘍が PCNSL の CPC に由来する可能性があることを示唆している。初期の段階で発生する遺伝学的イベントは *MYD88* 遺伝子の変異であり、CPC の出現はその次の遺伝子変異の獲得に続く可能性がある。これらのステップの正確な解明は、新たに開発された標的薬物によるより強力なバイオマーカーおよび治療アプローチの確立に寄与し得る。

## IGHV3- 23\*01 / D4- 23\*01 / J6\*02

```

CDR2-IMGT <-----FR3-IMGT-----
----->
Ref attagtgtagt.....ggtgtagcacatactacgcagactccgtgaag...ggccggttcaccatctccagagacaattccaagaacacgcgtgtatctgcacaatgaacacgcctgagagccgagacacgcgcgtatatctagt
Clone 5 -----a-----a-a-C-t-----t-----a-----g-----t-a-----a-----t-g-----
Clone11 -----a-----a-a-C-t-----t-----a-----g-----t-a-----a-----t-g-----
Clone17 -----a-----a-a-C-t-----t-----a-----g-----t-a-----a-----t-g-----
Clone19 -----a-----a-a-C-t-----t-----a-----g-----t-a-----a-----t-g-----

```

```

<V REGION> <---D REGION-----> <----- J REGION ----->
Ref      gccgaaga.actacggtgtaactcc..attactactactacgfatgacgtctgaggccaagygaccacggtcac
Clone 5  ---gtcga-----tg-----ct-----
Clone11  ---gtcga-----tg-----t---ct-----
Clone17  ---gtcga-----tg-----c---ct-----
Clone19  ---gtcga-----tg-----c---ct-----

```

```

_____ CDR2-IMGT _____<-----FR3-IMGT ----->
<----->
actagaacaagaactaacagttacaccacacagatacgcgcgtctgtgaa...ggcagattcacccattcaagagatgtatcaagaactcactgtatctgcaaatgaacagcctgaaacccgagacacgcgcgtgtattactgt
Clone 3 --c-----t-----g...g-----t-----a-t-----c-----a--cc-----
Clone 8 --c-----t-----g...g-----g-----t-----a-t-----c-----a--cc-----
Clone13 --c-----t-g-----g...g-----c-g-----t-----g-----a-t-----c-----a--cc-----
Clone18 --c-----t-----g...g-----g-----t-----a-t-----c-----a--cc-----

_____ CDR3 _____
<V REGION> <--D REGION--> <-----J REGION ----->
gctagaga....atagcagcggtctac....tacatgacgtctgtgggcaaaaggagaccacggtcac
Clone 3 at-----gttgca---a---c---taccaa---c-----c---c---ct-----
Clone 8 at-----gttgca---a---c---taccaa---c-----c---a---ct-----
Clone13 at-----gttgca---a---c---taccaa---c-----c---c---ct-----
Clone18 at-----gttgca---a---c---taccaa---c-----c---t---ct-----
```

```

_____ CDR2-IMGT _____<-----FR3-IMGT ----->
<-----V REGION ----->
Ref      ataatgtgtagt.....ggtgtagcacatactacgcagactccgttgaag...ggccggttcaccatctccagagacaattccaagaaacacgcgtgtatcttgcacaatgacacagccttgagagccgagagacacgcccgtatattactg
Clone12 --c--c-----g-----ga--g-----a--g-...-----gg--g--t-----gg-----a-----c-----aatga-
Clone16 --c--c-----g-----ga--g-----a--g-...-----gg--g--t-----gg-----a-----c-----aatga-

_____ CDR3 _____
<-----J REGION ----->
Ref      .....gctactttgactacttgggccaagggaccctgttcac
Clone12 cagcctgagagccgaggacacagcgccttcaatactgtgcgaaagatctcgggagatggttcgg--gag--ccacaac-----a-----
Clone16 cagcctgagagccgaggacacagcgccttcaatactgtgcgaaagatctcgggagatggttcgg--gag--ccacaac-----
```

IGHV3- 23\*01 / D2- 2\*01 / J6\*02

```

_____ CDR2-IMGT _____<-----FR3-IMGT ----->
<-----V REGION ----->
Clone 2 .....ggtgtagcacatactacgcagactccgttgaag...ggccggttcaccatctccagagacaattccaagaaacacgcgtgtatcttgcacaatgacacagccttgagagccgagagacacgcccgtatattactgt

_____ CDR3 _____
<V REGION> <---D REGION---> <-----J REGION ----->
gcgaaag.tattgtagtagtacagct..ctactactacggtatggacgltctggggccaagggacacagcgttcac
Clone 2 -----c-----tc-----g--ac-----
```

IGHV3- 23\*01 / D6- 19\*01 / J4\*01

```

_____ CDR2-IMGT _____<-----FR3-IMGT ----->
<----->
V REGION ----->
Ref   attagtgtagt.....ggtgtgacacatactacgcagactccggtgaag...ggccggttcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgacacagcctgagagccgagacacgccgtatatctgt
Clone10 ---ta-acg.....a-----c-----c-----t-----g-----

<V REGION><---D REGION--->          <----- J REGION ----->
Ref   gccgaaagaggtatagcagtggtg.....gactactggggccaaggaacccctgtcac
Clone10 a---g-a---t-----ctctgtccggtatg---gt-----c-----
```

IGHV3- 23\*01 / D3- 3\*01 / J3\*02

```

_____ CDR2-IMGT _____<-----FR3-IMGT ----->
<----->
V REGION ----->
attagtgtagt.....ggtgtgacacatactacgcagactccgtgaag...ggccggttcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgacacagcctgagagccgagacacgccgtatatctgt
Clone15 ---ta-acg.....a---t-----a-----g-t-----a-g-----

_____ CDR3 _____
<V REGION> <---D REGION--->          <----- J REGION ----->
gccgaaaga..gattttggagtggt..tgctttgatatctggggccaagggaacaatggtcac
Clone15 ---g-gtg-----gtc-----c---cc-----
```

```

_____ CDR2-IMGT _____<-----FR3-IMGT ----->
<----->
V REGION ----->
Ref  atctataccagt.....gggagcaccactacaacccctccctcaag...agtcgagtcaccatgtrcagtagacacggtccaaagaaccagttctccctgaagctgaagctctgtgaccgcgcgcgacacagcgcgtgtattactgt
Clone 1 ---tacc-g.....-g-----c---...-----a---g---g---a-t-----c-----a-g---g-----c---c-----g-t-----
_____ CDR3 _____
<V REGION>  <-D REGION-> <-----J REGION ----->
Ref  gcgagaga.....atagcatttt.ctactactacatggaagtcgtctgggcaagggagcaccacggtcac
Clone 1 ---g-gcgtcggg--c-t--c-c-t-----g-----c---t---ct-----
```

IGHV4- 4\*07 / D5- 24\*01 / J5\*01

```

_____ CDR2-IMGT _____<-----FR3-IMGT ----->
<----->
V REGION ----->
Ref  atctattacagt.....gggagcaccactacaacccctccctcaag...agtcgagtcaccatgtrcagtagacacggtccaaagaaccagttctccctgaagctgaagctctgtgaccgcgcgcgacacagcgcgtgtattactgt
Clone 6 -c---ag---.....-c---t-----t-----a-----a-----t-tc-----t-----c---t---
_____ CDR3 _____
<V REGION>  <-----D REGION----->  <-----J REGION ----->
Ref  gcgagaga.....gtagaatggctacaatt...gactcctggggccaaggaaccctgtgtcac
Clone 6 -----gccccgcga-----g-----tgtct-----t-----
```

B. T5 extra- CNS

IGHV4- 4\*07 / D5- 24\*01 / J4\*01

	CDR2		FR3-IMGT
	<----->		<----->
	<----->	V REGION	<----->
Ref	atctataccagt.....gggagcaccacatacaacccctcctcaag...agtcgagtcacatgtcagtagacacagctccaagaacacagttctccctgaaagctgtgtgacccgcgcgacacgcgcgtattactgt		
Clone 1	-----a-t-t-t-t-----tt-c---g-----t---t-----t-ga-----c-----		
Clone 2	-----a-t-t-t-t-----tt-c---g-----t---t-----t-ga-----c-----		
Clone 3	-----a-t-t-t-t-----tt-c---g-----t---t-----t-ga-----c-----		
Clone 5	-----a-t-t-t-t-----tt-c---g-----t---t-----t-ga-----c-----		
Clone 7	-----a-t-t-t-t-----tt-c---g-----t---t-----t-ga-----c-----		
Clone11	-----a-t-t-t-t-----tt-c---g-----t---t-----t-ga-----c-----		
Clone12	-----a-t-t-t-t-----tt-c---g-----t---t-----t-ga-----c-----		
Clone13	-----a-t-t-t-t-----tt-c---g-----t---t-----t-ga-----c-----		
Clone14	-----a-t-t-t-t-----tt-c---g-----t---t-----t-ga-----c-----		
Clone15	-----a-t-t-t-t-----tt-c---g-----t---t-----t-ga-----c-----		
Clone16	-----a-t-t-t-t-----tt-c---g-----t---t-----t-ga-----c-----		
Clone17	-----a-t-t-t-t-----tt-c---g-----t---t-----t-ga-----c-----		
Clone18	-----a-t-t-t-t-----tt-c---g-----t---t-----t-ga-----c-----		
Clone19	-----a-t-t-t-t-----tt-c---g-----t---t-----t-ga-----c-----		

```
<V REGION>      <D REGION>      <----- J REGION ----->
gcgagaga.....gatggtac.....actacttgactactggygccaagaaacctgtcac
Clone 1 -----ccggggcgc--g-t-g--ggactact-t--a-g--gt-----g-----
Clone 2 -----ccggggcgc--g-t-g--ggactact-t--a-g--gt-----
Clone 3
Clone 5 -----ccggggcgc--g-t-g--ggactact-t--a-g--gt-----
Clone 7 -----ccggggcgc--g-t-g--ggactact-t--a-g--gt-----
Clone11 -----ccggggcgc--g-t-g--ggactact-t--a-g--gt-----
Clone12 -----ccggggcgc--g-t-g--ggactact-t--a-g--gt-----C-----
Clone13 -----ccggggcgc--g-t-g--ggactact-t--a-g--gt-----
Clone14 -----ccggggcgc--g-t-g--ggactact-t--a-g--gt-----
Clone15 -----ccggggcgc--g-t-g--ggactact-t--a-g--gt-----C-----
Clone16 -----ccggggcgc--g-t-g--ggactact-t--a-g--gt-----
Clone17 -----ccggggcgc--g-t-g--ggactact-t--a-g--gt-----C-----
Clone18 -----ccggggcgc--g-t-g--ggactact-t--a-g--gt-----
Clone19 -----ccggggcgc--g-t-g--ggactact-t--a-g--gt-----
```



\_\_\_\_\_ CDR2-IMGT \_\_\_\_\_<----- FR3-IMGT ----->  
<----->  
Ref    ataaagcaagat.....ggaagtgagaaatactatgttgactctgtgaag...ggccgattcaccatctccagagacaacgccaagaactcactgtatctgcaatgacacagcctgagagccgagacacgctgtgtattactgt  
Clone 4 -----.....>----- V REGION ----->  
Clone 8 -----.....>----->  
Clone 9 -----.....>----->

\_\_\_\_\_ CDR3 \_\_\_\_\_>  
<V REGION>    <-----D REGION----->    <----- J REGION ----->  
Ref    gcgagaga.....gcataattgtgtgtgtgactgtatat.....ctactactacggtatgtgacgtctggggccaagggagaccacggtcac  
Clone 4 -----tttgagg-----t--ttcggcagcc-----c--ct-----  
Clone 8 -----tttgagg-----t--ctcggcagcc-----c--ct-----  
Clone 9 -----tttgagg-----t--ttcggcagcc-----c--ct-----

C. TP39 intra- CNS

IGHV4- 4\*07 / D5- 24\*01 / J4\*01

	CDR2		FR3-IMGT
	<----->		<----->
	<----->	V REGION	<----->
Ref	atctataccagt.....gggagcaccactacaacccctcctcaag...agtcgagtcacatgtcagtagacacagctccaagaacagttctccctgaaagctgtgtgacccgcgcgacacgcgcgtattactgt		
Clone 1	-----a-t-t-t-t-----t-t-c---g-----t---t-----t---ga---c-----c-----		
Clone 2	-----a-t-t-t-t-----t-t-c---g-----t---t-----t---ga---c-----c-----		
Clone 3	-----a-t-t-t-t-----t-t-c---g-----t---t-----t---ga---c-----c-----		
Clone 4	-----a-t-t-t-t-----t-t-c---g-----t---t-----t---ga---c-----c-----		
Clone 5	-----a-t-t-t-t-----t-t-c---g-----t---t-----t---ga---c-----c-----		
Clone 7	-----a-t-t-t-t-----t-t-c---g-----t---t-----t---ga---c-----c-----		
Clone 9	-----a-t-t-t-t-----t-t-c---g-----t---t-----t---ga---c-----c-----		
Clone11	-----a-t-t-t-t-----t-t-c---g-----t---t-----t---ga---c-----c-----		
Clone12	-----a-t-t-t-t-----t-t-c---g-----t---t-----t---ga---c-----c-----		
Clone14	-----a-t-t-t-t-----t-t-c---g-----t---t-----t---ga---c-----c-----		
Clone15	-----a-t-t-t-t-----t-t-c---g-----t---t-----t---ga---c-----c-----		
Clone16	-----a-t-t-t-t-----t-t-c---g-----t---t-----t---ga---c-----c-----		
Clone17	-----a-t-t-t-t-----t-t-c---g-----t---t-----t---ga---c-----c-----		
Clone18	-----a-t-t-t-t-----t-t-c---g-----t---t-----t---ga---c-----c-----		
Clone19	-----a-t-t-t-t-----t-t-c---g-----t---t-----t---ga---c-----c-----		
Clone20	-----a-t-t-t-t-nnn-t-----t-t-c---g-----t---t-----t---ga---c-----c-----		

	CDR3
Ref	gcgagagaga.....gatgctac.....actacttgactactgggccaaggaaccctgtcac
Clone 1	-----ccggggcgcc--g-t-g--ggactact-t--a-g--gt----->
Clone 2	-----ccggggcgcc--g-t-g--ggactact-t--ann--gt-----g-----
Clone 3	-----ccagggcgcc--g-t-g--ggactact-t--a-g--gt-----g-----
Clone 4	-----ccggggcgcc--g-t-g--ggactact-t--nnnnn-gnn-----
Clone 5	-----ccggggcgcc--g-t-g--ggactact-t--a-g--gt-----g-----
Clone 7	-----ccggggcgcc--g-t-g--ggactact-t--a-g--gt-----c-----
Clone 9	-----ccggggcgcc--g-t-g--ggactact-t--a-g--gt-----c-----
Clone11	-----ccggggcgcc--g-t-g--ggactact-t--a-g--gt-----
Clone12	-----ccggggcgcc--g-t-g--ggactact-t--a-g--gt-----c-----
Clone14	-----ccggggcgcc--g-t-g--ggactact-t--ann--gt-----g-----
Clone15	-----ccggggcgcc--g-t-g--ggactact-t--a-g--gt-----g-----
Clone16	--a-a-a-cgggggcgcc--g-c-a--ggactact-t-----g--gt-g-----c---
Clone17	-----ccggggcgcc--g-t-g--ggactact-t--a-g--gt-----g-----
Clone18	-----ccggggcgcc--g-t-g--ggactact-t--ann--gt-----c-----
Clone19	-----ccggggcgcc--g-t-g--ggactact-t--a-g--gc-----g-----
Clone20	-----ccggggcgcc--g-t-g--ggactact-t--a-g--gt-----g-----

```

      CDR2-IMGT  <----- FR3-IMGT ----->
      ----->
      <----- V REGION ----->
      <----->
      Ref  ataaagcaagat...ggaagtgaagaatactatgtgactctgtgaag...ggccgattcaccatctccagagacacgccaagaactcaatgttatctgcaatgacacgactgagagccgagagacacggtgtgtattactgt
      Clone 8 ----->

```

CDR3

<V REGION><-D REGION--> <----- J REGION ----->

Ref gcgagtgtgtgtatctgc.....cttggggccaagcaccctgttcac  
 Clone 8 -----t---t---agtgattacgaccgccacttactnctggggccaagcaccctgttcac

D. TP39 extra- CNS

IGHV3- 21\*01 / D6- 19\*01 / J4\*01

	CDR2	<	FR3-IMGT	>
		<----->		>
			V REGION	
Ref	attagtagtagt.....agtagtacatatactacgcagactcagtgaaq...	ggccgattcaccatctccagagacaacgccagaactcactgtatctgcaatgacacagcctgagagccgagacacgctgtattactgt		
Clone 1	--c--g-ac-----..g-g-c-a-g--c-t-t-g--c-----c-----..-g-----g-----t-----tgq-a-----c-----a-----t-----t-----			
Clone 2	--c--tac-----..g-g-c-a-g--c-t-t-g-----c-----..-g-----g-----t-----tgq-a-----c-----a-----t-----t-----			
Clone 3	--c--tac-----..g-g-c-a-g--c-t-t-g-----c-----..-g-----g-----t-----tgq-a-----c-----a-----t-----t-----			
Clone 4	--c--tac-----..g-g-c-a-g--c-t-t-g-----c-----..-g-----g-----t-----tgq-a-----c-----a-----t-----t-----			
Clone 5	--c--tac-----..gag-c-a-g--c-t-t-t-----c-----..-g-----g-----t-----tgq-a-----c-----a-----t-----t-----			
Clone 6	--c--tac-----..gag-c-a-g--c-t-t-g-----c-----..-g-----g-----t-----tgq-a-----c-----a-----t-----t-----			
Clone 9	--c--g-ac-----..g-g-c-a-g--c-t-t-g--c-----c-----..-g-----g-----t-----tgq-a-----c-----a-----t-----t-----			
Clone10	--c--g-ac-----..g-g-c-a-g--c-t-t-g--c-----c-----..-g-----g-----t-----tgq-a-----c-----a-----t-----t-----			
Clone12	--c--g-ac-----..g-g-c-a-g--c-t-t-g--c-----c-----..t-g-----g-----t-----tgq-a-----c-----a-----t-----t-----			
Clone13	--c--g-ac-----..g-g-c-a-g--c-t-t-g--c-----c-----..-g-----g-----t-----tgq-a-----c-----a-----t-----t-----			
Clone15	--c--tac-----..g-g-c-a-g--c-t-t-g-----c-----..-g-----g-----t-----tgq-a-----c-----a-----t-----t-----			
Clone16	--c--g-ac-----..g-g-c-a-g--c-t--g--c-----c-----..-g-----g-----t-----tgq-a-----c-----a-----t-----t-----			
Clone17	--c--tac-----..g-g-c-a-g--c-t-t-g--c-----c-----..-g-----g-----t-----tgq-a-----c-----a-----t-----t-----			
Clone19	--c--g-ac-----..g-g-c-a-g--c-t-t-g--c-----c-----..-g-----g-----t-----tgq-a-----c-----a-----t-----t-----			
Clone20	--c--tac-----..g-g-c-a-g--c-t-t-g-----c-----..-g-----g-----t-----tgq-a-----c-----a-----t-----t-----			

```

<V REGION>      <----D REGION----> <-----J REGION ----->
Ref      gcgagaga.....gggtatagcagtggctgg.actacttgactactggygccaaggaacccctgtcac
Clone 1  -----atcggcg--ag--t-----g--t-tat--a--t-----
Clone 2  -----atcggcg--ag--t-----c-tat--a--t-----c-----
Clone 3  -----atagng--aa--t-----c-tat--a--t--nnn--nnn-t-----
Clone 4  -----atcggcg--ag--t-----c-tat--a--t-----
Clone 5  -----atcggcg--ag--t-----cc-tat--a--t-----
Clone 6  -----atcggcg--ag--t-----c-tat--nan--t-----
Clone 9  -----atcggcg--ag--t-----g--t-tat--a--t-----
Clone10  -----atcggcg--ag--t-----g--t-tat--n--t-----c-----
Clone12  -----atcggcg--ag--t-----g--t-tat--a--t-----
Clone13  -n-----atcggcg--ag--t-----gtggttamtn-mlt-----c-----
Clone15  -----atcggcg--ag--t-----c-tatna--t-n-----c-----
Clone16  -----atcggcg--ag--t-----g--t-tat--a--t-----t-----
Clone17  -----atcggcg--ag--t-----tc-tat--a--t-----
Clone19  -----atcggcg--ag--t-----g--t-tat--a--n-n-----c-----
Clone20  nn-----atcggcg--ag--t-----cc-tatn-ann-tnnn-----

```

```

_____ CDR2-IMGT _____<-----FR3-IMGT ----->
<----->
V REGION ----->
Ref   atagaacaacagctaatggtggygaacaacagatagaccacgtctgtgaaa...ggcagattcaccaatccaagagatgattccaagaacatcacctatctgcaaatgacacagcctgagagccgagacacgctgtgtattactgt
Clone 7 --c-----a---g-----a-----g-----...-----c-----c--t-----a---g-----t-----c----->

_____ CDR3 _____
<V REGION> <-D REGION-><-----J REGION ----->
Ref   gcgag.ggtgtgtgattggaatgcttttgatatctgggccaagggaacaatggtcac
Clone 7 -----g---ct-t-a-----t-----c--cc----->
```

IGHV3- 33\*01 / D3- 16\*01 / J3\*01

```

_____ CDR2-IMGT _____<-----FR3-IMGT ----->
<----->
V REGION ----->
Ref   atatgttatgat....ggaagtaataataactatgcagactccgtgaag..ggccgattcacccatctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgagacacgctgtgtattactgt
Clone 8 -----.....-----g-----...----->

_____ CDR3 _____
<V REGION> <D REGION> <-----J REGION ----->
Ref   gcgagaga..ggggagttatgctt.....ctggggccaagggaacaatggtcac
Clone 8 -----ta---a---ag-----ntgacnn-----a--cc----->
```

```

_____ CDR2-IMGT _____<----- FR3-IMGT ----->
<----- V REGION ----->
Ref   atatggtatgat.....ggaaataataatactatgcagactccgttgaag...ggccgattcaccatctccagagacaattccaagaaacacgctgtatcttgcgaatgacacagccttgagagccgagagacacgctgttactgt
Clone1 -----c.....-t-----g-g-----a-----n-----n-----t-----
_____ CDR3 _____
<V REGION><-D REGION>      <--J REGION -->
Ref   gcgagagatatgtgtgtgta.....ctggggccaaggaaac
Clone1 -----g--aa---nttnntnnnat-----c-----
```



## 5. 全体の結語

PCNSL に対する変異解析を基盤として、3 つの研究を行った。

研究 1 においては、*MYD88* L265P 変異の有無が PCNSL の予後と関連することが示された。研究 2 においては、原発腫瘍で *MYD88* L265P 変異が陽性である PCNSL 患者の血清中 cell-free DNA を ddPCR で解析することで、約 60% の感度で同変異が検出できたことが判明した。研究 3 においては、PCNSL 腫瘍前駆細胞が中枢神経外の骨髄に存在する可能性が示唆され、*MYD88*L265P 変異が初期のイベントとして骨髄内の腫瘍前駆細胞に発現している可能性が示された。

以上の結果を通じて、本研究結果が PCNSL の予後判断や血清を用いた診断法に多大な寄与をする見込みがあることを証明することができた。

## 6. 謝辞

本研究を遂行するにあたっては、主として筑波大学医学医療系血液内科千葉滋博士(指導教員)、坂田(柳元)麻実子博士の指導のもとに行われた。ここに改めて深く感謝の意を表する。同血液内科末原泰人大学院生には、**cell-free DNA** の解析に際し、多大なる助言を頂いた。重ねて深く感謝の意を表する。

本研究室所属の阪下由香利技術補佐員には、次世代シーケンサーによる解析を行うにあたってテンプレートの調整及びシーケンシングを施行して頂いた。心より感謝の意を表する。

筑波大学医学医療系診断病理学研究室の野口雅之博士、佐藤泰樹博士、松岡亮太博士には腫瘍化した病理標本に対して診断・コメントを頂いた。ここに心より感謝の意を表する。

その他さまざまな形でご協力いただいた、多くの方々に心より感謝の意を表する。

## 7. 出典

本学位論文では *British journal of haematology* **2017**, *177*(3), 492-494. (Doi: 10.1111/bjh.14080, *Cancer science* **2018**, *109* (1), 225-230. (Doi: 10.1111/cas.13450), *Cancer science* **2018**, *110* (1), 401-407. (Doi: 10.1111/cas.13848)に掲載された論文の内容を、ワイリー・パブリッシング・ジャパン株式会社の規定に従って再利用している。

## 8. 参考文献

1. Villano, J. L.; Koshy, M.; Shaikh, H.; Dolecek, T. A.; McCarthy, B. J., Age, gender, and racial differences in incidence and survival in primary CNS lymphoma. *British journal of cancer* **2011**, *105* (9), 1414-8.
2. Martelli, M.; Ferreri, A. J.; Agostinelli, C.; Di Rocco, A.; Pfreundschuh, M.; Pileri, S. A., Diffuse large B-cell lymphoma. *Critical reviews in oncology/hematology* **2013**, *87* (2), 146-71.
3. Korfel, A.; Schlegel, U., Diagnosis and treatment of primary CNS lymphoma. *Nature reviews. Neurology* **2013**, *9* (6), 317-27.
4. Wang, C. C.; Carnevale, J.; Rubenstein, J. L., Progress in central nervous system lymphomas. *British journal of haematology* **2014**, *166* (3), 311-25.
5. Prica, A.; Chan, K.; Cheung, M. C., Combined modality therapy versus chemotherapy alone as an induction regimen for primary central nervous system lymphoma: a decision analysis. *British journal of haematology* **2012**, *158* (5), 600-7.
6. Morris, P. G.; Correa, D. D.; Yahalom, J.; Raizer, J. J.; Schiff, D.; Grant, B.; Grimm, S.; Lai, R. K.; Reiner, A. S.; Panageas, K.; Karimi, S.; Curry, R.; Shah, G.; Abrey, L. E.; DeAngelis, L. M.; Omuro, A., Rituximab, methotrexate, procarbazine, and vincristine followed by consolidation reduced-dose whole-brain radiotherapy and cytarabine in newly diagnosed primary CNS lymphoma: final results and long-term outcome. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **2013**, *31* (31), 3971-9.
7. Hattori, K.; Sakata-Yanagimoto, M.; Okoshi, Y.; Kato, T.; Kurita, N.; Yokoyama, Y.; Obara, N.; Takano, S.; Ishikawa, E.; Yamamoto, T.; Matsumura, A.; Hasegawa, Y.; Chiba, S., A single institutional retrospective evaluation for younger patients with primary central nervous lymphomas on a modified R-MPV regimen followed by radiotherapy and high dose cytarabine. *Journal of clinical and experimental hematopathology : JCEH* **2017**, *57* (2), 41-46.
8. Hoang-Xuan, K.; Taillandier, L.; Chinot, O.; Soubeyran, P.; Bogdhan, U.; Hildebrand, J.; Frenay, M.; De Beule, N.; Delattre, J. Y.; Baron, B., Chemotherapy alone as initial treatment for primary CNS lymphoma in patients older than 60 years: a multicenter phase II study (26952) of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor Group. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **2003**, *21* (14), 2726-31.
9. Taoka, K.; Okoshi, Y.; Sakamoto, N.; Takano, S.; Matsumura, A.; Hasegawa, Y.;

- Chiba, S., A nonradiation-containing, intermediate-dose methotrexate regimen for elderly patients with primary central nervous system lymphoma. *International journal of hematology* **2010**, *92* (4), 617-23.
10. Lee, S. Y.; Okoshi, Y.; Kurita, N.; Seki, M.; Yokoyama, Y.; Maie, K.; Hasegawa, Y.; Chiba, S., Prognosis factors in Japanese elderly patients with primary central nervous system lymphoma treated with a nonradiation, intermediate-dose methotrexate-containing regimen. *Oncology research and treatment* **2014**, *37* (7-8), 378-83.
11. Abrey, L. E.; Ben-Porat, L.; Panageas, K. S.; Yahalom, J.; Berkey, B.; Curran, W.; Schultz, C.; Leibel, S.; Nelson, D.; Mehta, M.; DeAngelis, L. M., Primary central nervous system lymphoma: the Memorial Sloan-Kettering Cancer Center prognostic model. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **2006**, *24* (36), 5711-5.
12. Alizadeh, A. A.; Eisen, M. B.; Davis, R. E.; Ma, C.; Lossos, I. S.; Rosenwald, A.; Boldrick, J. C.; Sabet, H.; Tran, T.; Yu, X.; Powell, J. I.; Yang, L.; Marti, G. E.; Moore, T.; Hudson, J., Jr.; Lu, L.; Lewis, D. B.; Tibshirani, R.; Sherlock, G.; Chan, W. C.; Greiner, T. C.; Weisenburger, D. D.; Armitage, J. O.; Warnke, R.; Levy, R.; Wilson, W.; Grever, M. R.; Byrd, J. C.; Botstein, D.; Brown, P. O.; Staudt, L. M., Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* **2000**, *403* (6769), 503-11.
13. Rosenwald, A.; Wright, G.; Chan, W. C.; Connors, J. M.; Campo, E.; Fisher, R. I.; Gascoyne, R. D.; Muller-Hermelink, H. K.; Smeland, E. B.; Giltner, J. M.; Hurt, E. M.; Zhao, H.; Averett, L.; Yang, L.; Wilson, W. H.; Jaffe, E. S.; Simon, R.; Klausner, R. D.; Powell, J.; Duffey, P. L.; Longo, D. L.; Greiner, T. C.; Weisenburger, D. D.; Sanger, W. G.; Dave, B. J.; Lynch, J. C.; Vose, J.; Armitage, J. O.; Montserrat, E.; Lopez-Guillermo, A.; Grogan, T. M.; Miller, T. P.; LeBlanc, M.; Ott, G.; Kvaloy, S.; Delabie, J.; Holte, H.; Krajci, P.; Stokke, T.; Staudt, L. M., The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *The New England journal of medicine* **2002**, *346* (25), 1937-47.
14. Hans, C. P.; Weisenburger, D. D.; Greiner, T. C.; Gascoyne, R. D.; Delabie, J.; Ott, G.; Muller-Hermelink, H. K.; Campo, E.; Braziel, R. M.; Jaffe, E. S.; Pan, Z.; Farinha, P.; Smith, L. M.; Falini, B.; Banham, A. H.; Rosenwald, A.; Staudt, L. M.; Connors, J. M.; Armitage, J. O.; Chan, W. C., Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* **2004**, *103* (1), 275-82.
15. Pasqualucci, L.; Trifonov, V.; Fabbri, G.; Ma, J.; Rossi, D.; Chiarenza, A.; Wells, V. A.; Grunn, A.; Messina, M.; Elliot, O.; Chan, J.; Bhagat, G.; Chadburn, A.; Gaidano, G.; Mullighan, C. G.; Rabadan, R.; Dalla-Favera, R., Analysis of the coding genome of diffuse

large B-cell lymphoma. *Nature genetics* **2011**, *43* (9), 830-7.

16. Morin, R. D.; Assouline, S.; Alcaide, M.; Mohajeri, A.; Johnston, R. L.; Chong, L.; Grewal, J.; Yu, S.; Fornika, D.; Bushell, K.; Nielsen, T. H.; Petrogiannis-Halioitis, T.; Crump, M.; Tosikyan, A.; Grande, B. M.; MacDonald, D.; Rousseau, C.; Bayat, M.; Sesques, P.; Froment, R.; Albuquerque, M.; Monczak, Y.; Oros, K. K.; Greenwood, C.; Riazalhosseini, Y.; Arseneault, M.; Camlioglu, E.; Constantin, A.; Pan-Hammarstrom, Q.; Peng, R.; Mann, K. K.; Johnson, N. A., Genetic Landscapes of Relapsed and Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphomas. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2016**, *22* (9), 2290-300.
17. Ngo, V. N.; Young, R. M.; Schmitz, R.; Jhavar, S.; Xiao, W.; Lim, K. H.; Kohlhammer, H.; Xu, W.; Yang, Y.; Zhao, H.; Shaffer, A. L.; Romesser, P.; Wright, G.; Powell, J.; Rosenwald, A.; Muller-Hermelink, H. K.; Ott, G.; Gascoyne, R. D.; Connors, J. M.; Rimsza, L. M.; Campo, E.; Jaffe, E. S.; Delabie, J.; Smeland, E. B.; Fisher, R. I.; Braziel, R. M.; Tubbs, R. R.; Cook, J. R.; Weisenburger, D. D.; Chan, W. C.; Staudt, L. M., Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature* **2011**, *470* (7332), 115-9.
18. Pasqualucci, L.; Dominguez-Sola, D.; Chiarenza, A.; Fabbri, G.; Grunn, A.; Trifonov, V.; Kasper, L. H.; Lerach, S.; Tang, H.; Ma, J.; Rossi, D.; Chadburn, A.; Murty, V. V.; Mullighan, C. G.; Gaidano, G.; Rabadan, R.; Brindle, P. K.; Dalla-Favera, R., Inactivating mutations of acetyltransferase genes in B-cell lymphoma. *Nature* **2011**, *471* (7337), 189-95.
19. Camilleri-Broet, S.; Criniere, E.; Broet, P.; Delwail, V.; Mokhtari, K.; Moreau, A.; Kujas, M.; Raphael, M.; Iraqi, W.; Sautes-Fridman, C.; Colombat, P.; Hoang-Xuan, K.; Martin, A., A uniform activated B-cell-like immunophenotype might explain the poor prognosis of primary central nervous system lymphomas: analysis of 83 cases. *Blood* **2006**, *107* (1), 190-6.
20. Rubenstein, J. L.; Fridlyand, J.; Shen, A.; Aldape, K.; Ginzinger, D.; Batchelor, T.; Treseler, P.; Berger, M.; McDermott, M.; Prados, M.; Karch, J.; Okada, C.; Hyun, W.; Parikh, S.; Haqq, C.; Shuman, M., Gene expression and angiotropism in primary CNS lymphoma. *Blood* **2006**, *107* (9), 3716-23.
21. Montesinos-Rongen, M.; Brunn, A.; Bentink, S.; Basso, K.; Lim, W. K.; Klapper, W.; Schaller, C.; Reifenberger, G.; Rubenstein, J.; Wiestler, O. D.; Spang, R.; Dalla-Favera, R.; Siebert, R.; Deckert, M., Gene expression profiling suggests primary central nervous system lymphomas to be derived from a late germinal center B cell. *Leukemia* **2008**, *22* (2), 400-5.
22. Gonzalez-Aguilar, A.; Idbaih, A.; Boisselier, B.; Habbita, N.; Rossetto, M.; Laurence, A.; Bruno, A.; Jouvett, A.; Polivka, M.; Adam, C.; Figarella-Branger, D.; Miquel, C.; Vital, A.; Ghesquieres, H.; Gressin, R.; Delwail, V.; Taillandier, L.; Chinot, O.; Soubeyran, P.; Gyan, E.; Choquet, S.; Houillier, C.; Soussain, C.; Tanguy, M. L.; Marie, Y.; Mokhtari, K.; Hoang-Xuan, K., Recurrent mutations of MYD88 and TBL1XR1 in primary central nervous system

lymphomas. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2012**, *18* (19), 5203-11.

23. Bruno, A.; Boisselier, B.; Labreche, K.; Marie, Y.; Polivka, M.; Jouvet, A.; Adam, C.; Figarella-Branger, D.; Miquel, C.; Eimer, S.; Houillier, C.; Soussain, C.; Mokhtari, K.; Daveau, R.; Hoang-Xuan, K., Mutational analysis of primary central nervous system lymphoma. *Oncotarget* **2014**, *5* (13), 5065-75.

24. Braggio, E.; Van Wier, S.; Ojha, J.; McPhail, E.; Asmann, Y. W.; Egan, J.; da Silva, J. A.; Schiff, D.; Lopes, M. B.; Decker, P. A.; Valdez, R.; Tibes, R.; Eckloff, B.; Witzig, T. E.; Stewart, A. K.; Fonseca, R.; O'Neill, B. P., Genome-Wide Analysis Uncovers Novel Recurrent Alterations in Primary Central Nervous System Lymphomas. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2015**, *21* (17), 3986-94.

25. Vater, I.; Montesinos-Rongen, M.; Schlesner, M.; Haake, A.; Purschke, F.; Sprute, R.; Mettenmeyer, N.; Nazzari, I.; Nagel, I.; Gutwein, J.; Richter, J.; Buchhalter, I.; Russell, R. B.; Wiestler, O. D.; Eils, R.; Deckert, M.; Siebert, R., The mutational pattern of primary lymphoma of the central nervous system determined by whole-exome sequencing. *Leukemia* **2015**, *29* (3), 677-85.

26. Fukumura, K.; Kawazu, M.; Kojima, S.; Ueno, T.; Sai, E.; Soda, M.; Ueda, H.; Yasuda, T.; Yamaguchi, H.; Lee, J.; Shishido-Hara, Y.; Sasaki, A.; Shirahata, M.; Mishima, K.; Ichimura, K.; Mukasa, A.; Narita, Y.; Saito, N.; Aburatani, H.; Nishikawa, R.; Nagane, M.; Mano, H., Genomic characterization of primary central nervous system lymphoma. *Acta neuropathologica* **2016**, *131* (6), 865-75.

27. Diaz, L. A., Jr.; Bardelli, A., Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **2014**, *32* (6), 579-86.

28. Zhang, J.; Grubor, V.; Love, C. L.; Banerjee, A.; Richards, K. L.; Mieczkowski, P. A.; Dunphy, C.; Choi, W.; Au, W. Y.; Srivastava, G.; Lugar, P. L.; Rizzieri, D. A.; Lagoo, A. S.; Bernal-Mizrachi, L.; Mann, K. P.; Flowers, C.; Naresh, K.; Evens, A.; Gordon, L. I.; Czader, M.; Gill, J. I.; Hsi, E. D.; Liu, Q.; Fan, A.; Walsh, K.; Jima, D.; Smith, L. L.; Johnson, A. J.; Byrd, J. C.; Luftig, M. A.; Ni, T.; Zhu, J.; Chadburn, A.; Levy, S.; Dunson, D.; Dave, S. S., Genetic heterogeneity of diffuse large B-cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2013**, *110* (4), 1398-403.

29. Yamada, S.; Ishida, Y.; Matsuno, A.; Yamazaki, K., Primary diffuse large B-cell lymphomas of central nervous system exhibit remarkably high prevalence of oncogenic MYD88 and CD79B mutations. *Leukemia & lymphoma* **2015**, *56* (7), 2141-5.

30. Ferreri, A. J.; Blay, J. Y.; Reni, M.; Pasini, F.; Spina, M.; Ambrosetti, A.; Calderoni, A.; Rossi, A.; Vavassori, V.; Conconi, A.; Devizzi, L.; Berger, F.; Ponzoni, M.; Borisch, B.;

- Tinguely, M.; Cerati, M.; Milani, M.; Orvieto, E.; Sanchez, J.; Chevreau, C.; Dell'Oro, S.; Zucca, E.; Cavalli, F., Prognostic scoring system for primary CNS lymphomas: the International Extranodal Lymphoma Study Group experience. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **2003**, *21* (2), 266-72.
31. Fernandez-Rodriguez, C.; Bellosillo, B.; Garcia-Garcia, M.; Sanchez-Gonzalez, B.; Gimeno, E.; Vela, M. C.; Serrano, S.; Besses, C.; Salar, A., MYD88 (L265P) mutation is an independent prognostic factor for outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia* **2014**, *28* (10), 2104-6.
  32. Kanda, Y., Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant*. **2013**, *48*, 452-458.
  33. Jeelall, Y. S.; Horikawa, K., Oncogenic MYD88 mutation drives Toll pathway to lymphoma. *Immunology and cell biology* **2011**, *89* (6), 659-60.
  34. Zhou, H. J.; Pham, L. V.; Tamayo, A. T.; Lin-Lee, Y. C.; Fu, L.; Yoshimura, L. C.; Ford, R. J., Nuclear CD40 interacts with c-Rel and enhances proliferation in aggressive B-cell lymphoma. *Blood* **2007**, *110* (6), 2121-7.
  35. Muldoon, L. L.; Alvarez, J. I.; Begley, D. J.; Boado, R. J.; Del Zoppo, G. J.; Doolittle, N. D.; Engelhardt, B.; Hallenbeck, J. M.; Lonser, R. R.; Ohlfest, J. R.; Prat, A.; Scarpa, M.; Smeyne, R. J.; Drewes, L. R.; Neuwelt, E. A., Immunologic privilege in the central nervous system and the blood-brain barrier. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **2013**, *33* (1), 13-21.
  36. Pham-Ledard, A.; Cappellen, D.; Martinez, F.; Vergier, B.; Beylot-Barry, M.; Merlio, J. P., MYD88 somatic mutation is a genetic feature of primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma, leg type. *The Journal of investigative dermatology* **2012**, *132* (8), 2118-20.
  37. Pastore, A.; Jurinovic, V.; Kridel, R.; Hoster, E.; Staiger, A. M.; Szczepanowski, M.; Pott, C.; Kopp, N.; Murakami, M.; Horn, H.; Leich, E.; Moccia, A. A.; Mottok, A.; Sunkavalli, A.; Van Hummelen, P.; Ducar, M.; Ennishi, D.; Shulha, H. P.; Hother, C.; Connors, J. M.; Sehn, L. H.; Dreyling, M.; Neuberg, D.; Moller, P.; Feller, A. C.; Hansmann, M. L.; Stein, H.; Rosenwald, A.; Ott, G.; Klapper, W.; Unterhalt, M.; Hiddemann, W.; Gascoyne, R. D.; Weinstock, D. M.; Weigert, O., Integration of gene mutations in risk prognostication for patients receiving first-line immunochemotherapy for follicular lymphoma: a retrospective analysis of a prospective clinical trial and validation in a population-based registry. *The Lancet. Oncology* **2015**, *16* (9), 1111-22.
  38. Wilson, W. H.; Young, R. M.; Schmitz, R.; Yang, Y.; Pittaluga, S.; Wright, G.; Lih, C. J.; Williams, P. M.; Shaffer, A. L.; Gerecitano, J.; de Vos, S.; Goy, A.; Kenkre, V. P.; Barr, P. M.; Blum, K. A.; Shustov, A.; Advani, R.; Fowler, N. H.; Vose, J. M.; Elstrom, R. L.; Habermann,



- T. M.; Barrientos, J. C.; McGreivy, J.; Fardis, M.; Chang, B. Y.; Clow, F.; Munneke, B.; Moussa, D.; Beaupre, D. M.; Staudt, L. M., Targeting B cell receptor signaling with ibrutinib in diffuse large B cell lymphoma. *Nature medicine* **2015**, *21* (8), 922-6.
39. Bernard, S.; Goldwirt, L.; Amorim, S.; Brice, P.; Briere, J.; de Kerviler, E.; Mourah, S.; Sauvageon, H.; Thieblemont, C., Activity of ibrutinib in mantle cell lymphoma patients with central nervous system relapse. *Blood* **2015**, *126* (14), 1695-8.
40. Illerhaus, G.; Schorb, E.; Kasenda, B., Novel agents for primary central nervous system lymphoma: evidence and perspectives. *Blood* **2018**, *132* (7), 681-688.
41. Grommes, C.; Pastore, A.; Palaskas, N.; Tang, S. S.; Campos, C.; Schartz, D.; Codega, P.; Nichol, D.; Clark, O.; Hsieh, W. Y.; Rohle, D.; Rosenblum, M.; Viale, A.; Tabar, V. S.; Brennan, C. W.; Gavrilovic, I. T.; Kaley, T. J.; Nolan, C. P.; Omuro, A.; Pentsova, E.; Thomas, A. A.; Tsyvkin, E.; Noy, A.; Palomba, M. L.; Hamlin, P.; Sauter, C. S.; Moskowitz, C. H.; Wolfe, J.; Dogan, A.; Won, M.; Glass, J.; Peak, S.; Lallana, E. C.; Hatzoglou, V.; Reiner, A. S.; Gutin, P. H.; Huse, J. T.; Panageas, K. S.; Graeber, T. G.; Schultz, N.; DeAngelis, L. M.; Mellinghoff, I. K., Ibrutinib Unmasks Critical Role of Bruton Tyrosine Kinase in Primary CNS Lymphoma. *Cancer discovery* **2017**, *7* (9), 1018-1029.
42. Lionakis, M. S.; Dunleavy, K.; Roschewski, M.; Widemann, B. C.; Butman, J. A.; Schmitz, R.; Yang, Y.; Cole, D. E.; Melani, C.; Higham, C. S.; Desai, J. V.; Ceribelli, M.; Chen, L.; Thomas, C. J.; Little, R. F.; Gea-Banacloche, J.; Bhaumik, S.; Stetler-Stevenson, M.; Pittaluga, S.; Jaffe, E. S.; Heiss, J.; Lucas, N.; Steinberg, S. M.; Staudt, L. M.; Wilson, W. H., Inhibition of B Cell Receptor Signaling by Ibrutinib in Primary CNS Lymphoma. *Cancer cell* **2017**.
43. Mandel, P.; Metais, P., [Not Available]. *Comptes rendus des seances de la Societe de biologie et de ses filiales* **1948**, *142* (3-4), 241-3.
44. Diehl, F.; Schmidt, K.; Choti, M. A.; Romans, K.; Goodman, S.; Li, M.; Thornton, K.; Agrawal, N.; Sokoll, L.; Szabo, S. A.; Kinzler, K. W.; Vogelstein, B.; Diaz, L. A., Jr., Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nature medicine* **2008**, *14* (9), 985-90.
45. Dawson, S. J.; Tsui, D. W.; Murtaza, M.; Biggs, H.; Rueda, O. M.; Chin, S. F.; Dunning, M. J.; Gale, D.; Forshe, T.; Mahler-Araujo, B.; Rajan, S.; Humphray, S.; Becq, J.; Halsall, D.; Wallis, M.; Bentley, D.; Caldas, C.; Rosenfeld, N., Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *The New England journal of medicine* **2013**, *368* (13), 1199-209.
46. Wang, S.; An, T.; Wang, J.; Zhao, J.; Wang, Z.; Zhuo, M.; Bai, H.; Yang, L.; Zhang, Y.; Wang, X.; Duan, J.; Wang, Y.; Guo, Q.; Wu, M., Potential clinical significance of a plasma-based KRAS mutation analysis in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2010**,

16(4), 1324-30.

47. Newman, A. M.; Bratman, S. V.; To, J.; Wynne, J. F.; Eclov, N. C.; Modlin, L. A.; Liu, C. L.; Neal, J. W.; Wakelee, H. A.; Merritt, R. E.; Shrager, J. B.; Loo, B. W., Jr.; Alizadeh, A. A.; Diehn, M., An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nature medicine* **2014**, *20* (5), 548-54.

48. Hamakawa, T.; Kukita, Y.; Kurokawa, Y.; Miyazaki, Y.; Takahashi, T.; Yamasaki, M.; Miyata, H.; Nakajima, K.; Taniguchi, K.; Takiguchi, S.; Mori, M.; Doki, Y.; Kato, K., Monitoring gastric cancer progression with circulating tumour DNA. *British journal of cancer* **2015**, *112* (2), 352-6.

49. Scholer, L. V.; Reinert, T.; Orntoft, M. W.; Kassentoft, C. G.; Arnadottir, S. S.; Vang, S.; Nordentoft, I.; Knudsen, M.; Lamy, P.; Andreasen, D.; Mortensen, F. V.; Knudsen, A. R.; Stribolt, K.; Sivesgaard, K.; Mouritzen, P.; Nielsen, H. J.; Laurberg, S.; Orntoft, T. F.; Andersen, C. L., Clinical Implications of Monitoring Circulating Tumor DNA in Patients with Colorectal Cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2017**, *23* (18), 5437-5445.

50. Hattori, K.; Sakata-Yanagimoto, M.; Okoshi, Y.; Goshima, Y.; Yanagimoto, S.; Nakamoto-Matsubara, R.; Sato, T.; Noguchi, M.; Takano, S.; Ishikawa, E.; Yamamoto, T.; Matsumura, A.; Chiba, S., MYD88 (L265P) mutation is associated with an unfavourable outcome of primary central nervous system lymphoma. *British journal of haematology* **2016**.

51. Nakamura, T.; Tateishi, K.; Niwa, T.; Matsushita, Y.; Tamura, K.; Kinoshita, M.; Tanaka, K.; Fukushima, S.; Takami, H.; Arita, H.; Kubo, A.; Shuto, T.; Ohno, M.; Miyakita, Y.; Kocalkowski, S.; Sasayama, T.; Hashimoto, N.; Maehara, T.; Shibui, S.; Ushijima, T.; Kawahara, N.; Narita, Y.; Ichimura, K., Recurrent mutations of CD79B and MYD88 are the hallmark of primary central nervous system lymphomas. *Neuropathology and applied neurobiology* **2015**.

52. Hattori, K.; Sakata-Yanagimoto, M.; Okoshi, Y.; Kato, T.; Kurita, N.; Yokoyama, Y.; Obara, N.; Takano, S.; Ishikawa, E.; Yamamoto, T.; Matsumura, A.; Hasegawa, Y.; Chiba, S., A single institutional retrospective evaluation for younger patients with primary central nervous lymphomas on a modified R-MPV regimen followed by radiotherapy and high dose cytarabine. *Journal of clinical and experimental hematopathology : JCEH* **2017**.

53. Brennan, C. W.; Verhaak, R. G.; McKenna, A.; Campos, B.; Nounmehr, H.; Salama, S. R.; Zheng, S.; Chakravarty, D.; Sanborn, J. Z.; Berman, S. H.; Beroukhi, R.; Bernard, B.; Wu, C. J.; Genovese, G.; Shmulevich, I.; Barnholtz-Sloan, J.; Zou, L.; Vegesna, R.; Shukla, S. A.; Ciriello, G.; Yung, W. K.; Zhang, W.; Sougnez, C.; Mikkelsen, T.; Aldape, K.; Bigner, D. D.; Van Meir, E. G.; Prados, M.; Sloan, A.; Black, K. L.; Eschbacher, J.; Finocchiaro, G.; Friedman, W.; Andrews, D. W.; Guha, A.; Iacocca, M.; O'Neill, B. P.; Foltz, G.; Myers, J.; Weisenberger,

- D. J.; Penny, R.; Kucherlapati, R.; Perou, C. M.; Hayes, D. N.; Gibbs, R.; Marra, M.; Mills, G. B.; Lander, E.; Spellman, P.; Wilson, R.; Sander, C.; Weinstein, J.; Meyerson, M.; Gabriel, S.; Laird, P. W.; Haussler, D.; Getz, G.; Chin, L., The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell* **2013**, *155* (2), 462-77.
54. Wan, J. C. M.; Massie, C.; Garcia-Corbacho, J.; Mouliere, F.; Brenton, J. D.; Caldas, C.; Pacey, S.; Baird, R.; Rosenfeld, N., Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. *Nature reviews. Cancer* **2017**, *17* (4), 223-238.
55. Mouliere, F.; El Messaoudi, S.; Gongora, C.; Guedj, A. S.; Robert, B.; Del Rio, M.; Molina, F.; Lamy, P. J.; Lopez-Crapez, E.; Mathonnet, M.; Ychou, M.; Pezet, D.; Thierry, A. R., Circulating Cell-Free DNA from Colorectal Cancer Patients May Reveal High KRAS or BRAF Mutation Load. *Translational oncology* **2013**, *6* (3), 319-28.
56. Yoon, K. A.; Park, S.; Lee, S. H.; Kim, J. H.; Lee, J. S., Comparison of circulating plasma DNA levels between lung cancer patients and healthy controls. *The Journal of molecular diagnostics : JMD* **2009**, *11* (3), 182-5.
57. Schwarzenbach, H.; Pantel, K., Circulating DNA as biomarker in breast cancer. *Breast cancer research : BCR* **2015**, *17* (1), 136.
58. Scherer, F.; Kurtz, D. M.; Newman, A. M.; Stehr, H.; Craig, A. F.; Esfahani, M. S.; Lovejoy, A. F.; Chabon, J. J.; Klass, D. M.; Liu, C. L.; Zhou, L.; Glover, C.; Visser, B. C.; Poultsides, G. A.; Advani, R. H.; Maeda, L. S.; Gupta, N. K.; Levy, R.; Ohgami, R. S.; Kunder, C. A.; Diehn, M.; Alizadeh, A. A., Distinct biological subtypes and patterns of genome evolution in lymphoma revealed by circulating tumor DNA. *Science translational medicine* **2016**, *8* (364), 364ra155.
59. Li, M.; Jia, Y.; Xu, J.; Cheng, X.; Xu, C., Assessment of the circulating cell-free DNA marker association with diagnosis and prognostic prediction in patients with lymphoma: a single-center experience. *Annals of hematology* **2017**, *96* (8), 1343-1351.
60. Fontanilles, M.; Marguet, F.; Bohers, E.; Viailly, P. J.; Dubois, S.; Bertrand, P.; Camus, V.; Mareschal, S.; Ruminy, P.; Maingonnat, C.; Lepretre, S.; Veresezan, E. L.; Derrey, S.; Tilly, H.; Picquenot, J. M.; Laquerriere, A.; Jardin, F., Non-invasive detection of somatic mutations using next-generation sequencing in primary central nervous system lymphoma. *Oncotarget* **2017**.
61. Roschewski, M.; Dunleavy, K.; Pittaluga, S.; Moorhead, M.; Pepin, F.; Kong, K.; Shovlin, M.; Jaffe, E. S.; Staudt, L. M.; Lai, C.; Steinberg, S. M.; Chen, C. C.; Zheng, J.; Willis, T. D.; Faham, M.; Wilson, W. H., Circulating tumour DNA and CT monitoring in patients with untreated diffuse large B-cell lymphoma: a correlative biomarker study. *The Lancet. Oncology* **2015**, *16* (5), 541-9.
62. Kurtz, D. M.; Green, M. R.; Bratman, S. V.; Scherer, F.; Liu, C. L.; Kunder, C. A.;

- Takahashi, K.; Glover, C.; Keane, C.; Kihira, S.; Visser, B.; Callahan, J.; Kong, K. A.; Faham, M.; Corbelli, K. S.; Miklos, D.; Advani, R. H.; Levy, R.; Hicks, R. J.; Hertzberg, M.; Ohgami, R. S.; Gandhi, M. K.; Diehn, M.; Alizadeh, A. A., Noninvasive monitoring of diffuse large B-cell lymphoma by immunoglobulin high-throughput sequencing. *Blood* **2015**, *125* (24), 3679-87.
63. Sakata-Yanagimoto, M.; Nakamoto-Matsubara, R.; Komori, D.; Nguyen, T. B.; Hattori, K.; Nanmoku, T.; Kato, T.; Kurita, N.; Yokoyama, Y.; Obara, N.; Hasegawa, Y.; Shinagawa, A.; Chiba, S., Detection of the circulating tumor DNAs in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Annals of hematology* **2017**, *96* (9), 1471-1475.
64. Bettegowda, C.; Sausen, M.; Leary, R. J.; Kinde, I.; Wang, Y.; Agrawal, N.; Bartlett, B. R.; Wang, H.; Luber, B.; Alani, R. M.; Antonarakis, E. S.; Azad, N. S.; Bardelli, A.; Brem, H.; Cameron, J. L.; Lee, C. C.; Fecher, L. A.; Gallia, G. L.; Gibbs, P.; Le, D.; Giuntoli, R. L.; Goggins, M.; Hogarty, M. D.; Holdhoff, M.; Hong, S. M.; Jiao, Y.; Juhl, H. H.; Kim, J. J.; Siravegna, G.; Laheru, D. A.; Lauricella, C.; Lim, M.; Lipson, E. J.; Marie, S. K.; Netto, G. J.; Oliner, K. S.; Olivi, A.; Olsson, L.; Riggins, G. J.; Sartore-Bianchi, A.; Schmidt, K.; Shih, M.; Oba-Shinjo, S. M.; Siena, S.; Theodorescu, D.; Tie, J.; Harkins, T. T.; Veronese, S.; Wang, T. L.; Weingart, J. D.; Wolfgang, C. L.; Wood, L. D.; Xing, D.; Hruban, R. H.; Wu, J.; Allen, P. J.; Schmidt, C. M.; Choti, M. A.; Velculescu, V. E.; Kinzler, K. W.; Vogelstein, B.; Papadopoulos, N.; Diaz, L. A., Jr., Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Science translational medicine* **2014**, *6* (224), 224ra24.
65. Pasqualucci, L.; Khiabani, H.; Fangazio, M.; Vasishtha, M.; Messina, M.; Holmes, A. B.; Ouillette, P.; Trifonov, V.; Rossi, D.; Tabbo, F.; Ponzoni, M.; Chadburn, A.; Murty, V. V.; Bhagat, G.; Gaidano, G.; Inghirami, G.; Malek, S. N.; Rabadan, R.; Dalla-Favera, R., Genetics of follicular lymphoma transformation. *Cell reports* **2014**, *6* (1), 130-40.
66. Wu, C.; de Miranda, N. F.; Chen, L.; Wasik, A. M.; Mansouri, L.; Jurczak, W.; Galazka, K.; Dlugosz-Danecka, M.; Machaczka, M.; Zhang, H.; Peng, R.; Morin, R. D.; Rosenquist, R.; Sander, B.; Pan-Hammarstrom, Q., Genetic heterogeneity in primary and relapsed mantle cell lymphomas: Impact of recurrent CARD11 mutations. *Oncotarget* **2016**.
67. Ferreri, A. J.; Reni, M., Primary central nervous system lymphoma. *Critical reviews in oncology/hematology* **2007**, *63* (3), 257-68.
68. Dubois, S.; Viailly, P. J.; Mareschal, S.; Bohers, E.; Bertrand, P.; Ruminy, P.; Maingonnat, C.; Jais, J. P.; Peyrouze, P.; Figeac, M.; Molina, T. J.; Desmots, F.; Fest, T.; Haïoun, C.; Lamy, T.; Copie-Bergman, C.; Briere, J.; Petrella, T.; Canioni, D.; Fabiani, B.; Coiffier, B.; Delarue, R.; Peyrade, F.; Bosly, A.; Andre, M.; Ketterer, N.; Salles, G.; Tilly, H.; Leroy, K.; Jardin, F., Next-Generation Sequencing in Diffuse Large B-Cell Lymphoma Highlights Molecular Divergence and Therapeutic Opportunities: a LYSA Study. *Clinical*

*cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2016**, 22(12), 2919-28.

69. Montesinos-Rongen, M.; Kuppers, R.; Schluter, D.; Spieker, T.; Van Roost, D.; Schaller, C.; Reifenberger, G.; Wiestler, O. D.; Deckert-Schluter, M., Primary central nervous system lymphomas are derived from germinal-center B cells and show a preferential usage of the V4-34 gene segment. *The American journal of pathology* **1999**, 155(6), 2077-86.
70. Thompsett, A. R.; Ellison, D. W.; Stevenson, F. K.; Zhu, D., V(H) gene sequences from primary central nervous system lymphomas indicate derivation from highly mutated germinal center B cells with ongoing mutational activity. *Blood* **1999**, 94(5), 1738-46.
71. Sekita, T.; Tamaru, J. I.; Kaito, K.; Katayama, T.; Kobayashi, M.; Mikata, A., Primary central nervous system lymphomas express Vh genes with intermediate to high somatic mutations. *Leukemia & lymphoma* **2001**, 41(3-4), 377-85.
72. Pels, H.; Montesinos-Rongen, M.; Schaller, C.; Van Roost, D.; Schlegel, U.; Wiestler, O. D.; Deckert, M., Clonal evolution as pathogenetic mechanism in relapse of primary CNS lymphoma. *Neurology* **2004**, 63(1), 167-9.
73. Mareschal, S.; Pham-Ledard, A.; Viailly, P. J.; Dubois, S.; Bertrand, P.; Maingonnat, C.; Fontanilles, M.; Bohers, E.; Ruminy, P.; Tournier, I.; Courville, P.; Lenormand, B.; Duval, A. B.; Andrieu, E.; Verneuil, L.; Vergier, B.; Tilly, H.; Joly, P.; Frebourg, T.; Beylot-Barry, M.; Merlio, J. P.; Jardin, F., Identification of Somatic Mutations in Primary Cutaneous Diffuse Large B-Cell Lymphoma, Leg Type by Massive Parallel Sequencing. *The Journal of investigative dermatology* **2017**, 137(9), 1984-1994.
74. Mao, Z.; Quintanilla-Martinez, L.; Raffeld, M.; Richter, M.; Krugmann, J.; Burek, C.; Hartmann, E.; Rudiger, T.; Jaffe, E. S.; Muller-Hermelink, H. K.; Ott, G.; Fend, F.; Rosenwald, A., IgVH mutational status and clonality analysis of Richter's transformation: diffuse large B-cell lymphoma and Hodgkin lymphoma in association with B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) represent 2 different pathways of disease evolution. *The American journal of surgical pathology* **2007**, 31(10), 1605-14.
75. Rossi, D.; Spina, V.; Deambrogi, C.; Rasi, S.; Laurenti, L.; Stamatopoulos, K.; Arcaini, L.; Lucioni, M.; Rocque, G. B.; Xu-Monette, Z. Y.; Visco, C.; Chang, J.; Chigrinova, E.; Forconi, F.; Marasca, R.; Besson, C.; Papadaki, T.; Paulli, M.; Larocca, L. M.; Pileri, S. A.; Gattei, V.; Bertoni, F.; Foa, R.; Young, K. H.; Gaidano, G., The genetics of Richter syndrome reveals disease heterogeneity and predicts survival after transformation. *Blood* **2011**, 117(12), 3391-401.
76. Parikh, S. A.; Kay, N. E.; Shanafelt, T. D., How we treat Richter syndrome. *Blood* **2014**, 123(11), 1647-57.
77. McCann, K. J.; Ashton-Key, M.; Smith, K.; Stevenson, F. K.; Ottensmeier, C. H.,

Primary central nervous system lymphoma: tumor-related clones exist in the blood and bone marrow with evidence for separate development. *Blood* **2009**, *113* (19), 4677-80.

78. Landau, D. A.; Tausch, E.; Taylor-Weiner, A. N.; Stewart, C.; Reiter, J. G.; Bahlo, J.; Kluth, S.; Bozic, I.; Lawrence, M.; Bottcher, S.; Carter, S. L.; Cibulskis, K.; Mertens, D.; Sougnez, C. L.; Rosenberg, M.; Hess, J. M.; Edelman, J.; Kless, S.; Kneba, M.; Ritgen, M.; Fink, A.; Fischer, K.; Gabriel, S.; Lander, E. S.; Nowak, M. A.; Dohner, H.; Hallek, M.; Neuberg, D.; Getz, G.; Stilgenbauer, S.; Wu, C. J., Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. *Nature* **2015**, *526* (7574), 525-30.

79. Chung, S. S.; Kim, E.; Park, J. H.; Chung, Y. R.; Lito, P.; Teruya-Feldstein, J.; Hu, W.; Beguelin, W.; Monette, S.; Duy, C.; Rampal, R.; Telis, L.; Patel, M.; Kim, M. K.; Huberman, K.; Bouvier, N.; Berger, M. F.; Melnick, A. M.; Rosen, N.; Tallman, M. S.; Park, C. Y.; Abdel-Wahab, O., Hematopoietic stem cell origin of BRAFV600E mutations in hairy cell leukemia. *Science translational medicine* **2014**, *6* (238), 238ra71.

80. Couronne, L.; Bastard, C.; Bernard, O. A., TET2 and DNMT3A mutations in human T-cell lymphoma. *The New England journal of medicine* **2012**, *366* (1), 95-6.

81. Sakata-Yanagimoto, M.; Enami, T.; Yoshida, K.; Shiraishi, Y.; Ishii, R.; Miyake, Y.; Muto, H.; Tsuyama, N.; Sato-Otsubo, A.; Okuno, Y.; Sakata, S.; Kamada, Y.; Nakamoto-Matsubara, R.; Tran, N. B.; Izutsu, K.; Sato, Y.; Ohta, Y.; Furuta, J.; Shimizu, S.; Komeno, T.; Sato, Y.; Ito, T.; Noguchi, M.; Noguchi, E.; Sanada, M.; Chiba, K.; Tanaka, H.; Suzukawa, K.; Nanmoku, T.; Hasegawa, Y.; Nureki, O.; Miyano, S.; Nakamura, N.; Takeuchi, K.; Ogawa, S.; Chiba, S., Somatic RHOA mutation in angioimmunoblastic T cell lymphoma. *Nature genetics* **2014**, *46* (2), 171-5.

82. Nguyen, T. B.; Sakata-Yanagimoto, M.; Nakamoto-Matsubara, R.; Enami, T.; Ito, Y.; Kobayashi, T.; Obara, N.; Hasegawa, Y.; Chiba, S., Double somatic mosaic mutations in TET2 and DNMT3A--origin of peripheral T cell lymphoma in a case. *Annals of hematology* **2015**, *94* (7), 1221-3.

83. Chapuy, B.; Roemer, M. G.; Stewart, C.; Tan, Y.; Abo, R. P.; Zhang, L.; Dunford, A. J.; Meredith, D. M.; Thorner, A. R.; Jordanova, E. S.; Liu, G.; Feuerhake, F.; Ducar, M. D.; Illerhaus, G.; Gusenleitner, D.; Linden, E. A.; Sun, H. H.; Homer, H.; Aono, M.; Pinkus, G. S.; Ligon, A. H.; Ligon, K. L.; Ferry, J. A.; Freeman, G. J.; van Hummelen, P.; Golub, T. R.; Getz, G.; Rodig, S. J.; de Jong, D.; Monti, S.; Shipp, M. A., Targetable genetic features of primary testicular and primary central nervous system lymphomas. *Blood* **2016**, *127* (7), 869-81.

84. Sugita, Y.; Terasaki, M.; Nakashima, S.; Ohshima, K.; Morioka, M.; Abe, H., Perivascular microenvironment in primary central nervous system lymphomas: the role of chemokines and the endothelin B receptor. *Brain tumor pathology* **2015**, *32* (1), 41-8.

85. Genovese, G.; Kahler, A. K.; Handsaker, R. E.; Lindberg, J.; Rose, S. A.; Bakhoum,

S. F.; Chambert, K.; Mick, E.; Neale, B. M.; Fromer, M.; Purcell, S. M.; Svantesson, O.; Landen, M.; Hoglund, M.; Lehmann, S.; Gabriel, S. B.; Moran, J. L.; Lander, E. S.; Sullivan, P. F.; Sklar, P.; Gronberg, H.; Hultman, C. M.; McCarroll, S. A., Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *The New England journal of medicine* **2014**, *371* (26), 2477-87.

86. Jaiswal, S.; Fontanillas, P.; Flannick, J.; Manning, A.; Grauman, P. V.; Mar, B. G.; Lindsley, R. C.; Mermel, C. H.; Burt, N.; Chavez, A.; Higgins, J. M.; Moltchanov, V.; Kuo, F. C.; Kluk, M. J.; Henderson, B.; Kinnunen, L.; Koistinen, H. A.; Ladenvall, C.; Getz, G.; Correa, A.; Banahan, B. F.; Gabriel, S.; Kathiresan, S.; Stringham, H. M.; McCarthy, M. I.; Boehnke, M.; Tuomilehto, J.; Haiman, C.; Groop, L.; Atzmon, G.; Wilson, J. G.; Neuberg, D.; Altshuler, D.; Ebert, B. L., Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *The New England journal of medicine* **2014**, *371* (26), 2488-98.